

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA
EN LA HEMOSTASIA DE LOS PACIENTES CON TROMBOCITOPENIA
INMUNE PRIMARIA**

RAÚL JUSTO SANZ

2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA EN LA HEMOSTASIA DE LOS PACIENTES CON TROMBOCITOPENIA INMUNE PRIMARIA

Tesis presentada por Raúl Justo Sanz para optar al título de Doctor en
Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid

DIRECTORES

Dra. Nora Butta Coll

Instituto para la Investigación Biomédica del
Hospital Universitario La Paz (FIBHULP)
Hospital Universitario la Paz-IdiPAZ

Dra. M^a Teresa Álvarez Román

Servicio de Hematología y Hemoterapia
Hospital Universitario la Paz-IdiPAZ

TUTOR

Dr. Víctor Jiménez Yuste

Servicio de Hematología y Hemoterapia
Hospital Universitario la Paz-IdiPAZ
Profesor Asociado de Ciencias de la Salud. Departamento de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

La **Dra. Nora Butta Coll**, Jefe de Laboratorio de Investigación de Coagulopatías y Trastornos de la Hemostasia de la Unidad de Hematología del Hospital Universitario la Paz-IdiPAZ; la **Dra. M^a Teresa Álvarez Román**, Jefe de Sección de Trombosis y Hemostasia del Hospital Universitario La Paz- IdiPAZ y el **Dr. Víctor Jiménez Yuste**, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ y Profesor Asociado de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

Certifican que

Raúl Justo Sanz ha realizado bajo su dirección el trabajo de título:

EFFECTO DE LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA EN LA HEMOSTASIA DE LOS PACIENTES CON TROMBOCITOPENIA INMUNE PRIMARIA

Y reúne el interés y condiciones suficientes para considerarlo apto para su presentación como tesis doctoral en el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente escrito en Madrid a 7 de diciembre de 2018.

Fdo: Dra. Nora Butta Coll

Fdo: M^a Teresa Álvarez Román

Fdo: Dr. Víctor Jiménez Yuste

A mis padres, Mar y Jesús, por vuestra paciencia todos estos años

A mis abuelos Marcos y Dulce por vuestra actitud y por ser ejemplo de entrega sin esperar nada a cambio

S.C.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Nora Butta Coll todo el apoyo recibido estos años. Sin su entrega y dedicación este trabajo no hubiera salido adelante. Gracias por la ilusión y el cariño que pones en el día a día.

A la Dra. M^a Teresa Álvarez Román y al Dr. Víctor Jiménez Yuste por su continuo soporte, orientación y por transmitirme que el trabajo multidisciplinar es necesario para lograr una investigación clínica traslacional de calidad que repercuta en el beneficio de nuestros pacientes.

A Mónica, Isa y Mer, por su apoyo en esta etapa y por facilitar la inclusión de pacientes.

A Sara por su energía y visión positiva que trasmite en todo momento, a Elena por las risas que nos hemos echado y por supuesto a Ihosvany, Paula y Tamara que me han ayudado en todo momento que lo he necesitado.

Agradecer a las enfermeras del Servicio de Donantes y del Servicio de Hematología del Hospital Universitario La Paz su apoyo y comprensión, que junto a auxiliares y secretarias, han hecho que este trabajo saliera adelante.

Por supuesto quiero agradecer a todos los pacientes que han colaborado y que de forma voluntaria han permitido que este trabajo pudiera realizarse.

A toda mi familia y amigos que han vivido de alguna forma este proyecto como si fuera suyo; a mis primos Alejandro y Álvaro por todos los buenos momentos vividos. En especial a mis padres, que me han apoyado en los momentos más difíciles y a mis abuelos, Marcos y Dulce, por los valores que me habéis inculcado desde siempre.

Este trabajo pudo realizarse gracias a la financiación FIS-FONDOS FEDER PI 15/01457.

ÍNDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS

Abreviaturas.....	19
Lista de figuras	25
Lista de tablas.....	29
Resumen	33
1. Introducción	41
1.1 Antecedentes	41
1.2 Plaquetas	44
1.2.1 Descubrimiento.....	44
1.2.2 Generalidades	45
1.2.3 Producción de plaquetas: megacariopoyesis	46
1.2.4 Vías de aclaramiento y apoptosis plaquetaria.....	52
1.2.5 Anatomía de las plaquetas	58
1.3 Hemostasia	68
1.3.1 Introducción	68
1.3.2 Hemostasia primaria.....	68
1.3.3 Hemostasia secundaria	71
1.3.4 Fibrinólisis	77
1.3.5 Regulación de la coagulación	80
1.4 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia	82
1.4.1 Tromboelastometría rotacional	82
1.4.2 Trombinografía automática calibrada.....	86
1.5 Aspectos generales de la trombocitopenia	89
1.5.1 Introducción	89
1.5.2 Clasificación fisiopatológica de la trombocitopenia	90
1.5.3 Trombocitopenia inmune primaria.....	94

1.5.4 Tratamiento de la PTI	109
2. Hipótesis	137
3. Objetivos	141
4. Materiales y Métodos.....	145
4.1 Sujetos del estudio	145
4.2 Extracción y preparación de las muestras	147
4.3 Cultivos celulares	147
4.4 Estudio de las características y función plaquetaria	148
4.5 Aislamiento y análisis de micropartículas	151
4.6 Determinación de la actividad procoagulante por CAT® y ROTEM®	151
4.7 Determinación de proteínas relacionadas con la fibrinólisis.....	153
4.8 Evaluación de la pérdida de ácido siálico de las proteínas de la membrana plaquetaria	154
4.9 Análisis estadístico	154
5. Resultados	157
5.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes	157
5.2 Plaquetas totales y plaquetas inmaduras en los distintos grupos de pacientes	164
5.3 Estudio de los niveles de trombopoyetina en los diferentes grupos de estudio	164
5.4 Cinética de formación del coágulo mediante tromboelastometría	165
5.5 Estudio de la actividad procoagulante del plasma	166
5.6 Estudio de la capacidad de activación plaquetaria	167
5.7 Expresión del receptor de fibrinógeno y del receptor para el factor de von Willebrand en la superficie de las plaquetas.....	170
5.8 Apoptosis de las plaquetas de los pacientes con PTI	172

5.9 Unión del complejo protrombinasa a las plaquetas	
en condiciones basales	172
5.10 Actividad de las caspasas en las plaquetas y en la línea celular	
megacarioblástica humana (MEG-01)	173
5.11 Evaluación de la capacidad trombogénica de las micropartículas	175
5.12 Proteínas relacionadas con la fibrinólisis	176
5.13 Efecto del tratamiento con AR-TPO en el contenido de	
PAI-1 en células MEG-01	178
5.14 Caracterización del patrón de glicosilación y de la pérdida de ácido siálico de	
las GPs de la membrana plaquetaria	178
6. Discusión	185
6.1 Recuento de plaquetas en los distintos grupos experimentales.....	185
6.2 Niveles plasmáticos de TPO y plaquetas inmaduras	186
6.3 Técnicas globales para evaluar la hemostasia: resultados del ROTEM®	187
6.4 Activación y funcionalidad plaquetaria	188
6.5 Apoptosis de las plaquetas de los pacientes con PTI	190
6.6 Capacidad trombogénica de las micropartículas	192
6.7 Características procoagulantes del plasma	193
6.8 Proteínas relacionadas con la fibrinólisis	194
6.9 Patrón de glicosilación plaquetario	195
6.10 Limitaciones del trabajo	198
7. Conclusiones	203
8. Referencias	207
9. Publicaciones.....	229

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACD: Ácido cítrico-dextrosa

Acs: Anticuerpos

ADP: Adenosín difosfato

Ags: Antígenos

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AMR: Receptor de Ashwell-Morell

AP: Altura al pico

APRIL: Ligando inductor de la proliferación del linfocito B

ARNm: ARN monocatenario

AR-TPO: Agonistas del receptor de trombopoyetina

AT: Antitrombina

ATP: Adenosín trifosfato

BAFF: Factor estimulador de linfocitos B

Breg: Linfocitos B reguladores

BTK: Tirosina quinasa de Bruton

CAT: Trombinografía automática calibrada

CD40L: CD40 ligando

CDs: Células dendríticas

CFT: Tiempo de formación del coágulo

CFU-GEMM: Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, megacariocitos y monocitos

CMF: Citometría de flujo

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: Células presentadoras de antígeno

CT: Tiempo de coagulación

EPI: Epinefrina

EPO: Eritropoyetina

ETP: Potencial endógeno de trombina

FBS: Suero fetal bovino

Fg: Fibrinógeno

FITC: Fluoresceína

FT: Factor tisular

FVW: Factor de von Willebrand

GPs: Glicoproteínas

HMWK: Quininógeno de alto peso molecular

HSC: Célula madre hematopoyética

IAP: Inhibidor de las proteínas apoptóticas

IGF-1: Factor de crecimiento *insulina-like*

Ig: Inmunoglobulina

IGIV: Inmunoglobulinas intravenosas

IL: Interleucina

IV: Índice de velocidad

K: Calicreína

Kcat: Constante de catalización

mAc: Anticuerpo monoclonal

MAC: Molécula de adhesión celular

MCF: Fortaleza máxima del coágulo

MEP: Célula progenitora mieloide y eritroide bipotencial

MKs: Megacariocitos

ML: Lisis máxima

MPs: Micropartículas

Neu: Neuroaminidasa

NK: Células *natural killer*

OCS: Sistema canalicular abierto

PAI: Inhibidor de t-PA

PAR: Receptores activados por proteasa

PC: Proteína C

PCa: Proteína C activada

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PE: Ficoeritrina

PK: Precalicroína

PLs: Fosfolípidos

PMC: Progenitor mieloide común

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

PS: Fosfatidilserina

PSGL-1: Ligando Glicoproteico 1 de la P-selectina

PTI: Trombocitopenia inmune primaria

ROTEM: Tromboelastometría rotacional

SMD: Síndromes mielodisplásicos

STD: Sistema tubular denso

TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina

TAP: Tiempo al pico

Tc: Células o linfocitos T citotóxicos

TEM: Tromboelastometría

TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

THF: Linfocitos T *helper* foliculares

Th: Células o linfocitos T *helper*

TL: Tiempo de latencia

TLR: Receptores tipo Toll

TM: Trombomodulina

TNF: Factor de necrosis tumoral

t-PA: Activador tisular del plasminógeno

TPO: Trombopoyetina

TPOR: Receptor de la trombopoyetina

Treg: Linfocitos T reguladores

TXA2: Tromboxano A2

u-PA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

VHC: Virus de la hepatitis C

VHB: Virus de la hepatitis B

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPM: Volumen plaquetario medio

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1. Linajes sanguíneos a partir de la HSC	47
Figura 2. Mecanismos citoesqueléticos de la producción de proplaquetas y liberación plaquetaria.....	48
Figura 3. Esquema propuesto de biogénesis plaquetaria en pulmón.	49
Figura 4. Producción, función y homeostasis de la TPO.	51
Figura 5. Generación hepática de TPO mediada por la subunidad GPIb α de plaquetas	52
Figura 6. Esquema en el que se representa la producción de TPO vía JAK2-STAT3 después de la unión de plaquetas desializadas al receptor de Ashwell-Morell (AMR).....	54
Figura 7. Vía intrínseca o mitocondrial.	55
Figura 8. Plaqueta con forma discoidea (estado de reposo) fotografiada en el microscopio electrónico de barrido.	59
Figura 9. Plaqueta activada, forma esferoidal con emisión de pseudópodos.....	59
Figura 10. Transformación interna de una plaqueta estimulada por trombina.	59
Figura 11. Receptores de plaquetas y señalización.	61
Figura 12. Cambios conformacionales del receptor del fibrinógeno.	63
Figura 13. Vía extrínseca de la coagulación. Fase de iniciación.	72
Figura 14. Mecanismos que participan en la vía de activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación.....	73
Figura 15. Fase de amplificación de la coagulación.	75
Figura 16. Fase de propagación de la coagulación.	76
Figura 17. Esquema de los sistemas anticoagulantes naturales de la coagulación.....	81
Figura 18. Mecanismo de la tromboelastometría rotacional (ROTEM®).....	83
Figura 19. Gráfico y parámetros de la tromboelastometría rotacional (ROTEM®).....	84
Figura 20. Trombinografía automática calibrada (CAT®).	88
Figura 21. Respuesta inmune en la trombocitopenia inmune primaria.	98
Figura 22. Mecanismos terapéuticos para el tratamiento de la PTI.	112

Figura 23. Estructura esquemática de una molécula de IgG.	120
Figura 24. Recuento de plaquetas y porcentaje de plaquetas reticuladas o inmaduras en los diferentes grupos de estudio por CMF.....	164
Figura 25. Niveles plasmáticos de TPO determinados por ELISA.	165
Figura 26. Resultados de la tromboelastometría rotacional (ROTEM®).	166
Figura 27. Valores obtenidos en la Trombinografía automática calibrada (CAT®).	167
Figura 28. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas en condiciones basales y tras la estimulación con TRAP (100 µM) y ADP (10 µM).....	168
Figura 29. Exposición de P-selectina en la superficie de las plaquetas en condiciones basales o estimuladas con TRAP (100 µM) y ADP (10 µM).	169
Figura 30. Expresión de CD63 en la superficie de las plaquetas tras la estimulación con TRAP 100 µM.	170
Figura 31. Expresión del receptor de Fg en la superficie de las plaquetas.	171
Figura 32. Expresión de las subunidades CD42a y CD42b del receptor para el FVW en la superficie de las plaquetas.....	171
Figura 33. Exposición de PS en la superficie de las plaquetas.....	172
Figura 34. Unión del complejo protrombinasa (FVaXa) a la PS expuesta en la superficie de las plaquetas.....	173
Figura 35. Actividad de las caspasas de las plaquetas.	174
Figura 36. Actividad de caspasas en la línea celular megacarioblástica MEG-01 a las 72h y a la semana de tratamiento con TPO y romiplostim.	175
Figura 37. Actividad procoagulante asociada a MPs.	176
Figura 38. Determinación de los niveles de PAI-1 en plasma y plaquetas.....	177
Figura 39. Niveles endógenos de PAI-1 en células MEG-01.	178
Figura 40. Unión de las lectinas FITC-ECA y FITC-WGA a las GPs de las plaquetas..	179
Figura 41. Unión de lectinas a las GPs de plaquetas y fagocitosis de plaquetas por las células HepG2.	180
Figura 42. Alteraciones de los glucanos de las GPs de la superficie plaquetaria que lleva a la eliminación plaquetaria.....	196

LISTA DE TABLAS

Lista de Tablas

Tabla 1. GPs de la membrana plaquetaria que participan en la adhesión y en el inicio de la agregación con sus ligandos correspondientes.....	64
Tabla 2. Valores de normalidad de los parámetros del ROTEM® según el test realizado.	86
Tabla 3. Causas de trombocitopenia de origen central.	92
Tabla 4. Causas de trombocitopenia adquirida de origen periférico.....	93
Tabla 5. Fases de la PTI.	94
Tabla 6. Pruebas complementarias recomendadas para el diagnóstico.	106
Tabla 7. Escala de sangrado de la OMS.	108
Tabla 8. Criterio de inicio de tratamiento en función del recuento plaquetario.	110
Tabla 9. Nomenclatura para definir los criterios de respuesta en la PTI.	111
Tabla 10. Fármacos utilizados en primera línea de tratamiento.....	113
Tabla 11. Dosis de corticoides empleadas en la práctica clínica.	114
Tabla 12. Mecanismos de acción de las IGIV divididos según la participación de las regiones de la molécula IgG.	121
Tabla 13. Estrategias terapéuticas utilizadas en segunda línea.....	122
Tabla 14. Inmunosupresores e inmunomoduladores en la PTI refractaria.	132
Tabla 15. Características clínicas y demográficas de los pacientes sin tratamiento para la PTI en el momento del estudio.	157
Tabla 16. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con AR-TPO.....	159
Tabla 17. Proteínas participantes en la fibrinólisis.	177
Tabla 18. Relación entre el % de unión de las lectinas ECA y WGA a las GPs de la membrana plaquetaria y el % de plaquetas fagocitadas por la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2.	181

RESUMEN

ANTECEDENTES

La trombocitopenia inmune primaria (PTI) es un trastorno autoinmune que se caracteriza por un recuento de plaquetas bajo y aislado (recuento inferior a 100×10^9 plaquetas/L) con grandes variaciones en el número, en la actividad de las plaquetas así como en su manifestación clínica. La etiopatogenia de la PTI incluye desde una reducción de la supervivencia plaquetaria debido a su destrucción periférica y una megacariopoyesis ineficaz con disminución de la producción de megacariocitos (MKs) y plaquetas, hasta una disregulación del sistema inmune que puede llegar a desencadenar hemorragias en los pacientes que la padecen.

Los pacientes con PTI se caracterizan por tener una alteración en la hemostasia primaria, desencadenando sangrado mucocutáneo, petequias, equimosis y bullas hemorrágicas en mucosas (fundamentalmente en la cavidad oral). En la mayoría de los casos la clínica de la PTI es leve, siendo las hemorragias intracraneales y gastrointestinales las más graves, pero también las menos frecuentes.

Dado que muchos pacientes presentan un fenotipo hemorrágico leve a pesar del bajo recuento plaquetario, los beneficios y los riesgos asociados a los tratamientos deben considerarse con precaución, ya que algunas alternativas terapéuticas como son los agonistas del receptor de trombopoyetina (AR-TPO) podrían suponer un riesgo trombótico adicional al estado del paciente, más si cabe el paciente ha sido sometido previamente a esplenectomía.

HIPÓTESIS

La escasa sintomatología hemorrágica que suelen presentar los pacientes con PTI hace pensar que podrían contar con algún mecanismo procoagulante compensatorio que disminuya el riesgo y la gravedad del sangrado causado por la trombocitopenia.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta propuesta es caracterizar la hemostasia de los pacientes con PTI, identificar los posibles mecanismos procoagulantes compensatorios de la trombocitopenia y evaluar el efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre los mismos. Para ello, en este estudio tratamos de: 1- Caracterizar la hemostasia en pacientes con PTI determinando las características funcionales de las plaquetas circulantes, la cinética de la generación de trombina y de la formación del coágulo. 2- Evaluar los mecanismos procoagulantes que podrían estar estimulados en los pacientes con PTI, entre los que se encuentra: el nivel de expresión de los receptores de adhesión en la superficie

plaquetaria y su capacidad de activación tras la estimulación con agonistas; la capacidad de exposición de fosfatidilserina (PS) en la superficie plaquetaria y anclaje del complejo protrombinasa; generación de micropartículas (MPs) celulares y su capacidad trombogénica; y la actividad del sistema fibrinolítico. 3- Determinar el efecto de los AR-TPO sobre los mecanismos previamente mencionados.

MÉTODOS

Se reclutaron un total de 82 pacientes con PTI primaria crónica según los criterios definidos por *Rodeghiero et al (2009)*, desde septiembre de 2015 hasta diciembre de 2017 en la Sección de Hemostasia del Servicio de Hematología del Hospital Universitario la Paz. Cuarenta pacientes estaban sin tratamiento desde al menos seis meses antes de realizar el estudio (78% mujeres, edad media de $51,7 \pm 20,1$ años) y otros cuarenta y dos tratados con los AR-TPO durante al menos dos meses antes de realizar el estudio (53% mujeres, edad media de $64,9 \pm 17,4$ años). Ciento doce sujetos sanos (55% mujeres, edad media 57 ± 25 años) reclutados en la Sección de Donantes del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario La Paz también fueron incluidos en el estudio.

Se utilizó la citometría de flujo (CMF) para estudiar la función plaquetaria, cuantificar las plaquetas inmaduras, actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 de las plaquetas, exposición de PS y anclaje del complejo protrombinasa a la superficie plaquetaria así como para analizar el patrón de unión de diferentes lectinas a las glicoproteínas (GPs) de la superficie plaquetaria.

Para estudiar de forma global la cinética de formación del coágulo y la fibrinólisis se utilizó la tromboelastometría rotacional (ROTEM®). Para determinar la capacidad procoagulante del plasma se usó un test de generación de trombina, concretamente la trombinografía calibrada automatizada o CAT® (Calibrated Automated Thrombogram, Thrombinoscope®). La capacidad procoagulante asociada a MPs se determinó mediante un método cromogénico utilizando los kits de MP-Activity y MP-FT-Activity de ZYMUPHEN®. Tanto la determinación de los niveles plasmáticos de TPO, los de t-PA y u-PA así como la actividad de TAFI se realizaron mediante la técnica de ELISA.

RESULTADOS

Los pacientes con PTI tenían menor número de plaquetas que los individuos sanos, no observándose diferencias entre ambos grupos de pacientes con PTI. El número de plaquetas inmaduras fue más alto en los pacientes con PTI que en los controles, lo que se traduce en una médula ósea que trata de compensar la aumentada destrucción periférica de plaquetas con un aumento de la síntesis de plaquetas que no han

completado totalmente su proceso de maduración. Los niveles plasmáticos de TPO en los dos grupos de pacientes con PTI fueron mayores que en el grupo control.

Resultado del estudio de la cinética de formación del coágulo por ROTEM® en plasma rico en plaquetas (PRP) ajustado a 25.000 plaquetas, se obtuvo que la fortaleza máxima del coágulo (MCF) fue mayor en las muestras de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO y la lisis del coágulo a los 60 minutos fue menor que en el grupo control, destacando el perfil procoagulante de los pacientes tratados con los AR-TPO.

Para intentar justificar si el perfil procoagulante observado en el ROTEM® de los pacientes tratados con los AR-TPO podría deberse a la mayor capacidad de generar trombina del plasma o a la propia reactividad de las plaquetas de estos pacientes, se realizó el CAT® en muestras de plasma pobre en plaquetas (PPP) y se estudió la capacidad de activación plaquetaria en PRP respectivamente. En el CAT® no hubo diferencias entre los distintos grupos en el tiempo de latencia (o *lagtime*), pero sí un aumento en el ETP y en el pico del trombograma en los dos grupos de pacientes de PTI respecto de los controles sanos. No se encontraron diferencias entre los grupos en el estado de activación basal de las plaquetas, salvo en la mayor expresión de P-selectina en las plaquetas sin estimular de los pacientes tratados con los AR-TPO. Por el contrario, tras la activación con TRAP las plaquetas de los pacientes con PTI sin tratamiento y tratados con los AR-TPO unieron menos PAC1 y expusieron menos P-selectina y CD63 que el grupo control.

Como los pacientes con PTI presentaban una actividad plaquetaria anómala se decidió estudiar la apoptosis en las plaquetas de estos pacientes. Las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO exponían más PS en su superficie que las plaquetas de los controles sanos. Esta PS expuesta en la superficie plaquetaria era funcional para el anclaje del complejo protrombinasa (FVaXa) debido a que la unión de este complejo se encontró aumentado en los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO, justificando al menos en parte, el perfil procoagulante obtenido en el ROTEM® de estos pacientes. Con el objeto de evaluar si la mayor exposición de PS observada en la superficie de las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO se correspondía con una mayor apoptosis en sus plaquetas, determinamos la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 por CMF y demostramos que su actividad estaba aumentada en las plaquetas de los pacientes tratados con los AR-TPO. Igualmente se obtuvo que los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO tenían mayor capacidad trombogénica asociada a MPs que el grupo sin tratamiento y que los individuos sanos.

Para determinar si el tratamiento con los AR-TPO era realmente el responsable del aumento de la apoptosis observado en las plaquetas de los individuos con PTI sometidos a ese tratamiento, estudiamos el efecto *in vitro* de la TPO y del romiplostim en células MEG-01 respecto a un grupo control (sin tratamiento). A las 72 horas de tratamiento la actividad de la caspasa 3 fue mayor en los grupos de MEG-01 tratados con TPO y con romiplostim respecto al grupo control. Tras una semana de tratamiento, la actividad de la caspasa 3 fue igual en todos los grupos, pero la actividad de las caspasas 8 y 9 fue mayores en los grupos tratados con TPO y con romiplostim.

Se determinaron los niveles plasmáticos de t-PA y u-PA así como la actividad de TAFI en el plasma y no hubo diferencias entre los grupos. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles plasmáticos y en el contenido plaquetario de PAI-1 en muestras del grupo de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO, lo que podría justificar el perfil hipofibrinolítico de estos pacientes observado en el ROTEM®. Con el fin de determinar si el tratamiento con los AR-TPO era responsable del aumento en el contenido de PAI-1 plaquetario, se realizaron experimentos en células MEG-01 incubadas con tampón y con TPO o romiplostim. Tanto la TPO como el romiplostim aumentaron el contenido endógeno de PAI-1 en las células MEG-01.

CONCLUSIÓN

- El estudio de la cinética de la formación del coágulo de los pacientes de PTI tratados con los AR-TPO mostró un perfil procoagulante en estos pacientes que se puso de manifiesto con un aumento en la máxima fortaleza del coágulo y en una disminución de la fibrinólisis.
- Este efecto no parece estar relacionado con un aumento en la capacidad de activación de las plaquetas ya que, por el contrario, las plaquetas de todos los pacientes son hiporreactivas al estímulo con agonistas. No obstante, se observó un aumento en la expresión de P-selectina en condiciones basales en la superficie de las plaquetas de estos pacientes, lo podría favorecer la interacción entre plaquetas-células blancas y podría aumentar la fortaleza del coágulo.
- Las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO mostraron más signos de apoptosis que las de los pacientes que no recibían tratamiento. Estos signos incluían un aumento en la exposición de PS y en la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9.

- La sobreexposición de PS aumentó la superficie disponible para la unión del complejo protrombinasa (FXaVa). Este hecho podría constituir un mecanismo procoagulante compensatorio que podría reducir el riesgo de sangrado de los pacientes con PTI.
- Los experimentos realizados en células MEG-01 sugirieron que los AR-TPO podrían tener un efecto inductor de la actividad de las caspasas de las plaquetas.
- La apoptosis aumentada de las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO podría ser la responsable de generar más MPs y, consecuentemente, de la mayor capacidad de generar trombina asociada a MPs observada en estos pacientes.
- El tratamiento con los AR-TPO de los pacientes con PTI induce un aumento de los niveles plasmáticos y plaquetarios de PAI-I, lo que podría justificar el perfil hipofibrinolítico y procoagulante observado en estos pacientes.
- La glicosilación y las características de sialinización de las plaquetas de los pacientes con PTI puede ser clave para entender la fisiopatología de la enfermedad y las diferencias en las manifestaciones clínicas de los pacientes y el efecto que podrían tener las distintas alternativas terapéuticas disponibles.
- La evaluación global de la hemostasia y el estudio de los mecanismos procoagulantes compensatorios asociados al tratamiento con los AR-TPO deberían tenerse en cuenta a la hora de decidir la conveniencia y la pauta de tratamiento a recomendar en los pacientes con PTI y no basar la decisión exclusivamente en los recuentos plaquetarios.
- Es recomendable conocer las comorbilidades asociadas al paciente con PTI y hacer una evaluación clínica cuidadosa para detectar a aquellos con estados protrombóticos (incluida la esplenectomía), que podrían tener consecuencias negativas en la calidad de vida de los pacientes con PTI. De esta forma podríamos ofrecer una medicina de precisión a estos pacientes y optimizar los tratamientos y sus costes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Las plaquetas, además de regular la hemostasia, participan en otros procesos fisiológicos como son la trombosis [1], la inflamación [2], la remodelación tisular [3] y los mecanismos de defensa innata [4, 5].

La participación de las plaquetas en la hemostasia está bien caracterizada: una vez producida la rotura del endotelio vascular y la exposición del subendotelio se ponen en marcha una serie de reacciones que inducen la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial, la activación plaquetaria por agentes de naturaleza diversa liberados en el lugar de la lesión y, finalmente, la formación de agregados celulares. De este modo se forma un tapón plaquetario que reduce la pérdida de sangre y facilita la coagulación o hemostasia secundaria, proporcionando el soporte para el ensamblado y activación de los factores de coagulación. El papel de estos últimos sería la retracción y el fortalecimiento del coágulo.

La experiencia previa indica que la adhesión y la agregación plaquetaria están mediadas por el reconocimiento y la unión de unas proteínas adhesivas (colágeno, factor de von Willebrand ó FvW, fibrinógeno (Fg), fibronectina, trombospondina y vitronectina) que interaccionan con receptores específicos presentes en la superficie plaquetaria. De estos receptores, el complejo GPIb-IX-V (receptor plaquetario para el FvW), el heterodímero GPIIb-GPIIIa (integrina α IIb- β 3 ó receptor de Fg) y las integrinas α 2 β 1 y GPVI (receptores de colágeno), son los de mayor importancia cualitativa y cuantitativa. Estos receptores participan en las funciones hemostáticas, al igual que lo hacen las diferentes proteínas adhesivas en sus distintas formas moleculares (solubles en plasma, de gránulos o insolubles en la matriz subendotelial).

Las plaquetas se forman a partir de los megacariocitos (MKs), células de gran tamaño con núcleos poliploides, que les permiten lograr una producción masiva de éstas. La producción de plaquetas está fuertemente regulada por una serie de factores de crecimiento y citoquinas, siendo el principal regulador de la megacariopoyesis la trombopoyetina (TPO), ligando para el receptor Mpl [6], que junto con otros factores como son la interleucina-3 (IL-3), el factor SDF-1 y el microambiente en el que se desarrollan los megacarioblastos ejercen un efecto sinérgico destinado a la estimulación de la megacariopoyesis [7, 8] y por tanto a la producción de plaquetas.

Los principales lugares de producción de TPO son las células endoteliales sinusoidales y parenquimales del hígado y los túbulos contorneados proximales del riñón [9]. La TPO es liberada en la sangre para llegar a las células diana presentes en los órganos hematopoyéticos. Se ha demostrado claramente que los niveles circulantes de TPO se correlacionan inversamente con la masa de plaquetas [10]. El receptor Mpl ó TPOR (cuyo uno de sus ligandos endógenos es la TPO) se expresa de forma específica en la superficie celular de los precursores megacariocíticos, MKs maduros, plaquetas y células madre hematopoyéticas (HSC).

La apoptosis, junto con la megacariopoyesis, juega un papel importante en el mantenimiento del número de plaquetas [11, 12] en un rango fisiológico de entre 150 a 400×10^9 plaquetas/L en condiciones normales. Las plaquetas permanecen en la circulación entre 8 y 10 días, para posteriormente ser destruidas en el bazo y, en menor grado, en el hígado y en la médula ósea. El envejecimiento de las plaquetas se manifiesta con cambios estructurales en su membrana (pérdida de ácido siálico y alteraciones en la distribución de fosfolípidos [PLs] y la presencia de anticuerpos [Acs]) en su superficie. En este proceso también está involucrada la apoptosis, ya que las plaquetas pueden sufrir apoptosis por la vía intrínseca o extrínseca. La pérdida de función de la proteína Bcl-xL libera a las moléculas proapoptóticas Bak/Bax quienes activan a las caspasas, responsables de la expresión en superficie de señales que llevarán a la destrucción celular [13, 14].

El mantenimiento fisiológico del número de plaquetas en la circulación se debe al correcto balance entre su producción y destrucción. Por tanto, cuando el número de plaquetas desciende por debajo de 100×10^9 /L hablamos de trombocitopenia, que presenta diversas manifestaciones clínicas según su gravedad. Cuando las plaquetas están por debajo de 50×10^9 /L la sintomatología hemorrágica es variada. El paciente puede estar asintomático o tener hemorragias ante mínimos traumatismos, pero si la cifra está por debajo de 20×10^9 /L puede tener hemorragias de riesgo vital.

La trombocitopenia puede ser de origen central, periférico o una combinación de ambas. Cuando es de origen central la trombocitopenia puede producirse por una anomalía en uno de los precursores de las plaquetas o por afectación de las células madre pluripotenciales, en cuyo caso se asociaría a otras citopenias. Este tipo de trombocitopenia se observa en los pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD) y en los pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia mieloablativa.

La trombocitopenia periférica se produce por consumo o por destrucción de las plaquetas. La trombocitopenia inmune primaria (PTI) es un trastorno caracterizado por

trombocitopenia, con grandes variaciones en el número y en la actividad de las plaquetas y en su manifestación clínica. Del mismo modo, se ha observado que la clínica de los pacientes con PTI no se correlaciona de manera estricta con el número de plaquetas, lo que indica la participación de múltiples factores en la sintomatología hemorrágica de estos pacientes. Anteriormente se creía que la trombocitopenia en la PTI era causada por autoanticuerpos dirigidos contra las proteínas de las plaquetas, que eran destruidas por las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial. No obstante, la ausencia de autoanticuerpos detectables en algunos pacientes con PTI sugiere la existencia de otros mecanismos asociados, como por ejemplo una desregulación de la megacariopoyesis. En este sentido, el conocimiento de los numerosos factores que regulan la megacariopoyesis sugiere la posible existencia de un desequilibrio entre los mismos como causantes de la PTI, así como otros mecanismos fisiopatológicos implicados en la aumentada destrucción plaquetaria y en su menor producción a nivel medular.

Si bien algunos pacientes con PTI presentan trombocitopenia grave (con hemorragia importante que obliga a iniciar o a modificar el tratamiento [15]), las manifestaciones de sangrado no son tan frecuentes ni intensas como cabría esperar a pesar de que la capacidad de activación plaquetaria esté disminuida respecto a controles sanos cuando se estimulan por diferentes agonistas plaquetarios. Por ello, los pacientes con trombocitopenia que no sangran deben tener algún mecanismo procoagulante compensatorio que atenúe el riesgo de sangrado. Entre estos mecanismos compensatorios destacan la fosfatidilserina (PS) expuesta en la superficie plaquetaria, la liberación de micropartículas (MPs) con capacidad protrombogénica y la posible descompensación del sistema que regula la fibrinólisis.

En células quiescentes, existe una distribución asimétrica de los lípidos en la membrana, en particular de la PS que está mayoritariamente en el lado interno, mientras que los lípidos del lado externo contienen fundamentalmente colina (fosfatidilcolina y esfingomielina). Durante la activación plaquetaria y la apoptosis de las plaquetas se expone PS en la superficie de éstas, lo que acelera la formación del trombo y ofrece la superficie catalítica necesaria para varios de los complejos enzimáticos del proceso de la coagulación, como por ejemplo, el anclaje del complejo protrombinasa. Estos hechos promueven la capacidad procoagulante de las plaquetas [16-18]. Otra consecuencia de la desorganización de los PLs de la membrana plaquetaria es la liberación de MPs a partir de las membranas celulares. Estas MPs presentan una superficie rica en PS y en elementos de las células de las que se originan (por ejemplo factor tisular [FT], receptores para ligandos de adhesión, etc.) hecho que les confiere una elevada capacidad procoagulante y trombogénica [19-21].

Por otra parte, una vez formado el coágulo, las redes de fibrina se degradan tras la activación de plasminógeno a plasmina por acción de la uroquinasa (u-PA) y del activador tisular del plasminógeno (t-PA), producidos por el endotelio vascular. La fibrinólisis puede ser inhibida a nivel de la activación del plasminógeno por el inhibidor del t-PA (PAI-1), por el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), y a nivel de la plasmina por la α 2-antiplasmina [22]. Si bien la activación excesiva del sistema fibrinolítico puede predisponer al sangrado, una disminución en su función constituye un factor de riesgo de trombosis. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la posible función compensadora que podría estar asociada a alteraciones en el sistema fibrinolítico en trombocitopenias como la PTI y los SMD.

Dado que se desconoce el curso clínico a largo plazo de la PTI crónica y que muchos pacientes presentan una morbilidad mínima a pesar de la enfermedad, los beneficios y los riesgos relativos asociados a los tratamientos deben considerarse con precaución, ya que algunos tratamientos podrían suponer un riesgo trombótico adicional al estado del paciente.

1.2 PLAQUETAS

1.2.1 DESCUBRIMIENTO

En la comunicación presentada por Leewenhoeck en la Real Sociedad de Londres, Hewson fue el primero en describir a las plaquetas en 1780 como “pequeñas partículas no definidas de la sangre”. Un histólogo francés, Alfred Donne [23], las definió como “pequeños glóbulos derivados del plasma, corpúsculos de opalina visibles en la sangre, una especie globular pequeña y pálida”. Los mismos corpúsculos se describen más adelante por Beale en 1850 como “partículas de materia germinal (Körnchen Bioplasma)” y por Zimmermann (1860) como “pequeños corpúsculos (Körperchen)” sin ampliar mucha más información sobre las mismas. Sin embargo, fue entre 1865 y 1877 cuando estos corpúsculos más pequeños que leucocitos y eritrocitos se caracterizaron claramente, aunque no se detalló entonces ni su origen ni su función [24, 25].

Fue en 1882 cuando Giulio Bizzozzero estableció una descripción más precisa de estos corpúsculos al establecer su forma ovalada o redonda y confirmar sus propiedades

adhesivas. Igualmente afirmó que las plaquetas no podían ser consideradas como precursores de los eritrocitos al no contener ni hemoglobina ni material nuclear en su interior. No obstante, el mayor logro de Bizzozzero fue detallar el papel de la función plaquetaria en la hemostasia y en la trombosis.

El descubrimiento de las plaquetas y su función tuvo lugar cuando el conocimiento sobre los mecanismos de coagulación de la sangre aún no estaba descritos al detalle. De hecho, de las moléculas involucradas en la coagulación, sólo habían sido identificados la trombina [26] y el Fg [27]. La protrombina se descubrió por Pechelharin en 1892 [28], el papel del calcio por Arthus en 1890 [29] y el clásico esquema de la coagulación se describió por Morawitz en 1905 [30]. No fue hasta 1906 cuando James Horner Wright describe a las plaquetas como fragmentos del citoplasma de los MKs y establece a éstos últimos como los elementos básicos de la megacariopoyesis [31].

1.2.2 GENERALIDADES

Las plaquetas son los elementos formes más pequeños de la sangre. Son células anucleadas de 1–2 μm de tamaño, generadas en la médula ósea por fragmentación de los bordes de los MKs y que se acumulan en el lugar donde el endotelio es disfuncional o está dañado, permitiendo el inicio de la formación del trombo. En condiciones fisiológicas su número se encuentra dentro de un rango de 150 a 400×10^9 /L y la vida media de las mismas es de 7 a 10 días.

Además de ser el efector celular de la hemostasia, las plaquetas se depositan en los sitios de lesión y modulan tanto procesos inmunes de defensa innata como inflamatorios. Las plaquetas participan en los procesos inmunes por medio de los receptores tipo Toll (TLR) [32, 33] y su interacción con los leucocitos, así como en los procesos inflamatorios mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [32]. Las plaquetas también participan en la remodelación tisular [3, 34] y en situaciones patológicas como la trombosis [1].

La participación de las plaquetas en el proceso de la hemostasia es fundamental. Las principales funciones en las que participan son:

- Adhesión a la pared del subendotelio expuesto tras la rotura del endotelio vascular o a la zona lesionada del vaso.
- Extensión de la plaqueta sobre la superficie endotelial expuesta.

- Activación plaquetaria por agentes de naturaleza diversa liberados en el lugar de la lesión y posterior secreción del contenido granular de las plaquetas al medio.
- Formación de un agregado plaquetario firme y estable.

El resultado final es la formación de un tapón plaquetario que reduce de forma rápida la pérdida de sangre y que sirve como estructura de soporte para el papel que juegan los factores de coagulación en el proceso conocido como hemostasia secundaria.

1.2.3 PRODUCCIÓN DE PLAQUETAS: MEGACARIOPOYESIS

Células madre hematopoyéticas (HSC)

El sistema hematopoyético tiene como principal función eliminar de la circulación las células defectuosas o aquellas que ya han cumplido con su ciclo de vida y reemplazarlas por células nuevas del mismo tipo, logrando un equilibrio fisiológico de éstas [35]. Este sistema está integrado por células con diferentes localizaciones en el organismo como son: la médula ósea, la sangre y el sistema linfoide, de tal forma que, a partir de una HSC [36] se pueden originar todos los linajes sanguíneos. Las HSC presentan características y funciones que las hacen diferentes a cualquier otro tipo celular, y hace que sean muy importantes en el adecuado funcionamiento del sistema hematopoyético. Entre estas funciones cabe destacar [37]:

1) **Son multipotentes:** Tienen la capacidad de generar todos los linajes sanguíneos a partir de ellas. Los linajes sanguíneos se dividen en tres grandes grupos (Figura 1):

- La línea blanca que produce:
 1. Células linfoides: linfocitos B y T.
 2. Células mieloides: basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, monocitos y macrófagos.
- La línea roja que produce eritrocitos.
- La línea trombocítica que da origen a MKs y plaquetas.

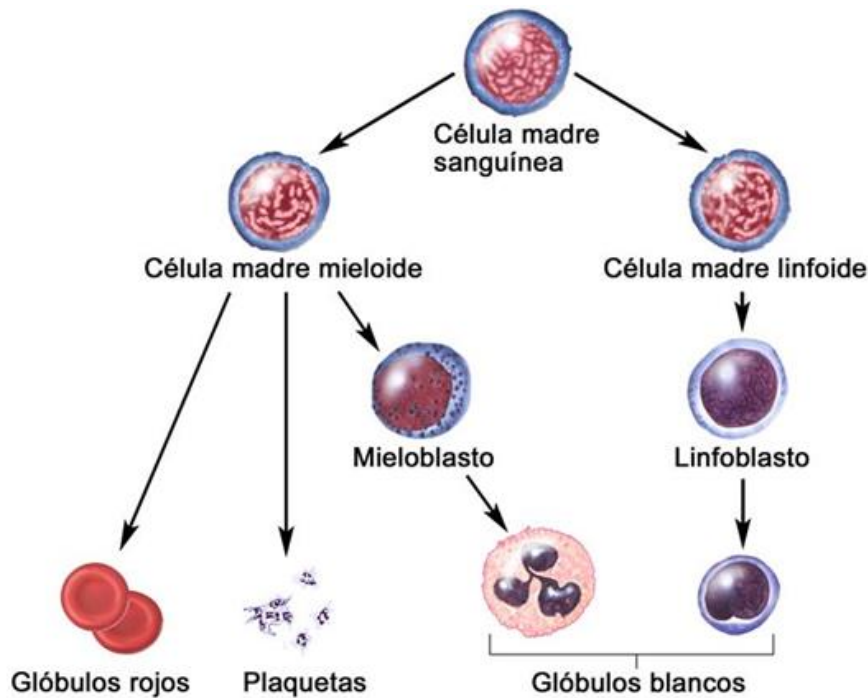


Figura 1. Linajes sanguíneos a partir de la HSC. *Adaptado de Terese Winslow (2007).*

- 2) **Poseen un potencial proliferativo elevado:** Son capaces de dividirse y dar origen a un gran número de células maduras a lo largo de la vida.
- 3) **Son auto-renovables:** Presentan la capacidad de generar nuevas HSC idénticas a sus predecesoras, manteniendo así la simetría en sus procesos de división.

Megacariopoyesis

La megacariopoyesis es el proceso por el cual se producen plaquetas de forma diaria para mantener cifra entre 150 a $400 \times 10^9/L$, y junto con la eliminación de las plaquetas envejecidas, se logra un equilibrio fisiológico entre su producción y destrucción.

La megacariopoyesis implica el compromiso de las HSC, la proliferación y la diferenciación terminal de los progenitores megacariocíticos y la maduración de los MKs. Esto es así ya que las plaquetas provienen de fragmentos del citoplasma de los MKs, que durante su reorganización emiten pseudópodos por evaginación de su membrana. Los gránulos traccionan sobre los pseudópodos y los fragmentos de proplaquetas se liberan a la circulación, donde se transforman en plaquetas maduras (Figura 2) [38].

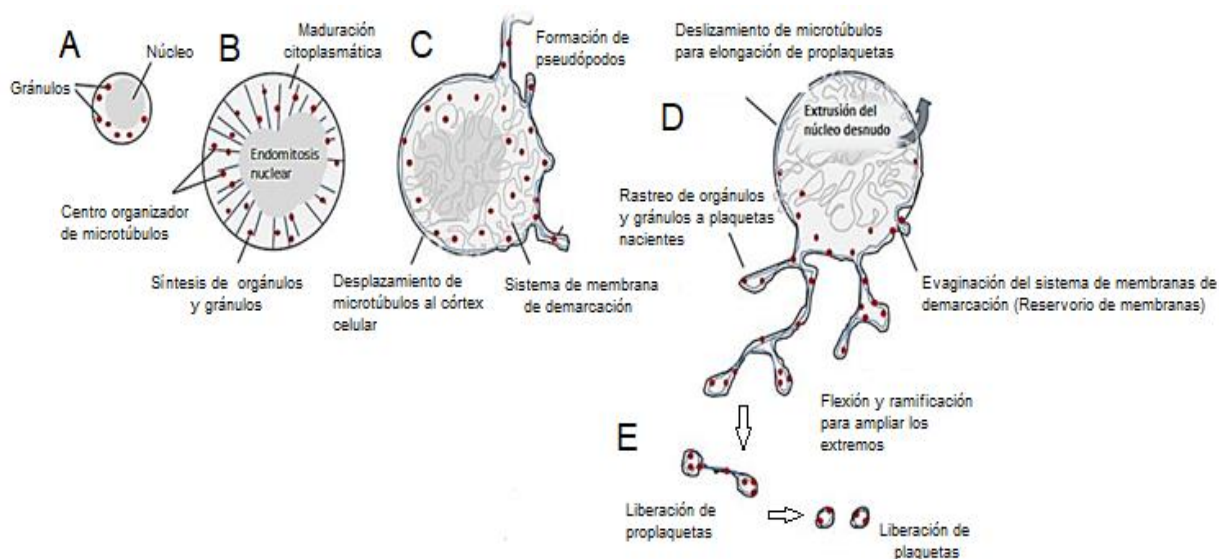


Figura 2. Mecanismos citoesqueléticos de la producción de proplaquetas y liberación plaquetaria. Se producen una serie de eventos para la transición a MKs de células inmaduras (A) hasta la liberación plaquetaria (E). (B) Los MKs inmaduros se someterán a repetidos ciclos de endomitosis nuclear para la síntesis de orgánulos y la expansión y maduración citoplasmática. (C) Antes del inicio de la formación de proplaquetas, los microtúbulos se desplazan al córtex celular. El sistema de membranas de demarcación continuo con la membrana celular proporciona un reservorio de membrana para el crecimiento de proplaquetas. (D) El deslizamiento de microtúbulos promueve la elongación de la proplaqueta a medida que los orgánulos son localizados en los extremos, mientras la flexión y ramificación amplifica los extremos de la proplaqueta. (E) El citoplasma de MKs se convierte en una masa completa de proplaquetas, que se liberan de la célula. El movimiento de los microtúbulos prolonga las plaquetas que son liberadas. (*Adaptado de Thon y Italiano, 2010*)

En el microambiente de la médula ósea se distinguen dos “nichos” diferentes, el osteoclástico y el vascular. Para la maduración del MK y la formación de plaquetas se requiere la migración del “nicho” osteoclástico al vascular. En este proceso los MKs se colocan adyacentes a las células endoteliales regulando la migración de los mismos para la posterior megacariopoyesis gracias a los gradientes de quimioquinas, factores de crecimiento, calcio, oxígeno e interacciones adhesivas entre ellos.

Los precursores de los MKs se desarrollan a partir del progenitor mieloide común (PMC) derivado de las HSC en los nichos especializados en la médula ósea. El PMC se origina a partir de la célula más indiferenciada de la megacariopoyesis, una célula pluripotencial común con el resto de células mieloides, la unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, MKs y monocitos (ó CFU-GEMM). La CFU-GEMM puede diferenciarse en una célula progenitora mieloide y eritroide bipotencial (MEP), que a su vez da origen tanto a la serie megacariocítica como a la eritroide. Por tanto esta MEP se diferencia hacia los

precursores de la serie megacariocítica, que expresarán la GPIIb-IIIa, y las glicoproteínas GPV y GPIb [39].

En humanos, el recuento de MKs es de 0,05-0,1% de las células nucleadas de la médula ósea. Su diámetro es de 30-25µm y su volumen de 4.700 ± 100 fL [40]. Aunque durante muchos años se ha considerado que la médula ósea es el lugar tradicional de la producción de plaquetas, estudios recientes han puesto en evidencia que el pulmón es también un lugar de biogénesis plaquetaria. Se cree que núcleos gigantes de MKs que han perdido parte del citoplasma salen de la médula ósea y se acumulan en los vasos pulmonares, siendo capaces de producir plaquetas activas (Figura 3) [41, 42].

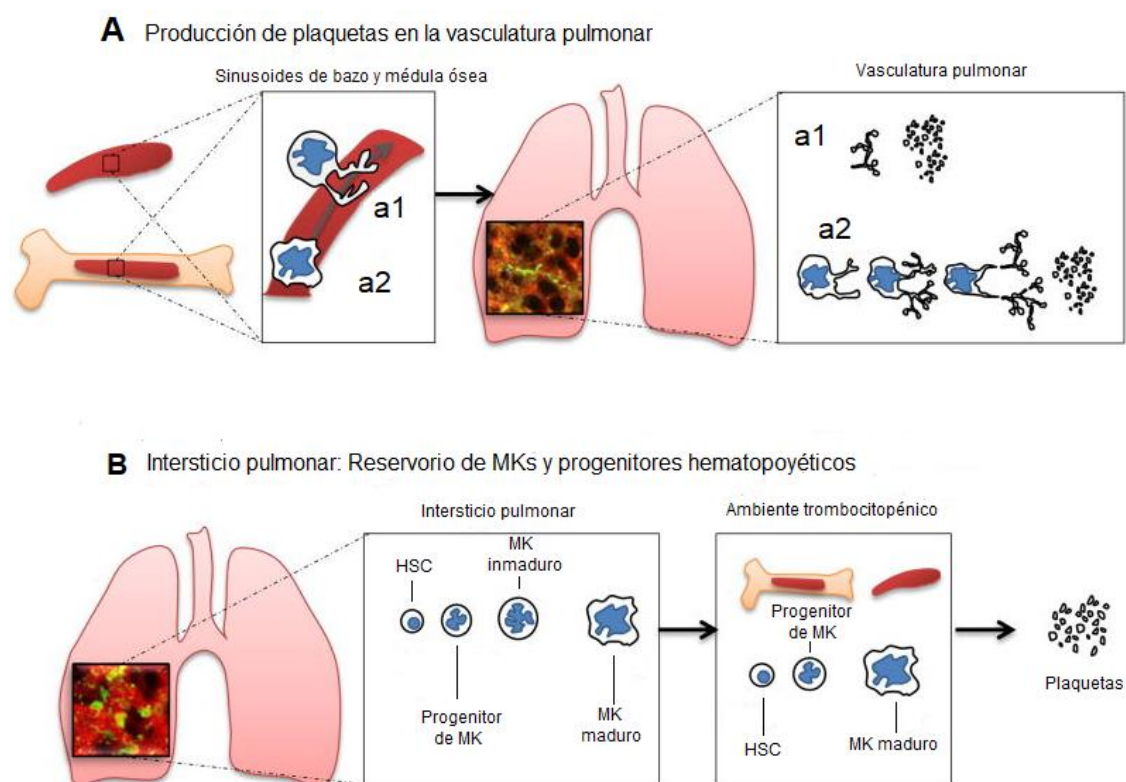


Figura 3. Esquema propuesto de biogénesis plaquetaria en pulmón.

El papel del pulmón en la biogénesis de las plaquetas es doble y se produce en dos compartimentos diferentes:

(A) Producción de plaquetas en la vasculatura pulmonar. Después de ser liberados de la médula ósea o del bazo, las proplaquetas (a1) y MKs (a2) se retienen en la vasculatura pulmonar, el primer lecho capilar encontrado por cualquier célula que abandona la médula ósea, donde se observa la formación y extensión de proplaquetas para la liberación final de plaquetas.

(B) Los MKs maduros e inmaduros junto con los progenitores hematopoyéticos se encuentran en el intersticio pulmonar. En ambientes trombocitopénicos, los progenitores hematopoyéticos del pulmón migran y restablecen las deficiencias hematopoyéticas de la médula ósea. (*Adaptado de Lefrancais et al, 2017*).

El mediador más importante de la megacariopoyesis es la TPO. Su síntesis se produce mayoritariamente en hígado (células del parénquima hepático y células endoteliales de los sinusoides hepáticos), aunque pueden producirla otros tipos celulares (células del túbulo proximal del riñón y células del estroma de la médula ósea) [39, 43]. La TPO se une a su receptor Mpl ó TPOR de MKs y plaquetas, activando las vías de señalización intracelulares JAK2-STAT3/5, PI3K-AKT y MAPK que inducirán la expresión de factores de transcripción y estimularán a su vez la producción de plaquetas. Muchas de estas vías de señalización y factores de transcripción implicados son comunes a la línea eritroide y son activados también por la eritropoyetina (EPO) [44, 45]. Por otra parte, la TPO también es un factor esencial involucrado en la diferenciación de las HSC.

Después de la síntesis constante de TPO en hígado, se libera a la circulación sin ser almacenada y es eliminada rápidamente de la circulación mediante endocitosis por MKs y plaquetas. Dado que el nivel de TPO circulante es inversamente proporcional a la masa de plaquetas, la disminución del número de plaquetas lleva a un incremento en los niveles de TPO debido a una disminución de su degradación. En cambio, un aumento en el número de plaquetas produce una mayor unión de TPO a su receptor plaquetario, disminuyendo la concentración plasmática de TPO y reduciendo la producción y maduración plaquetaria (Figura 4) [46].

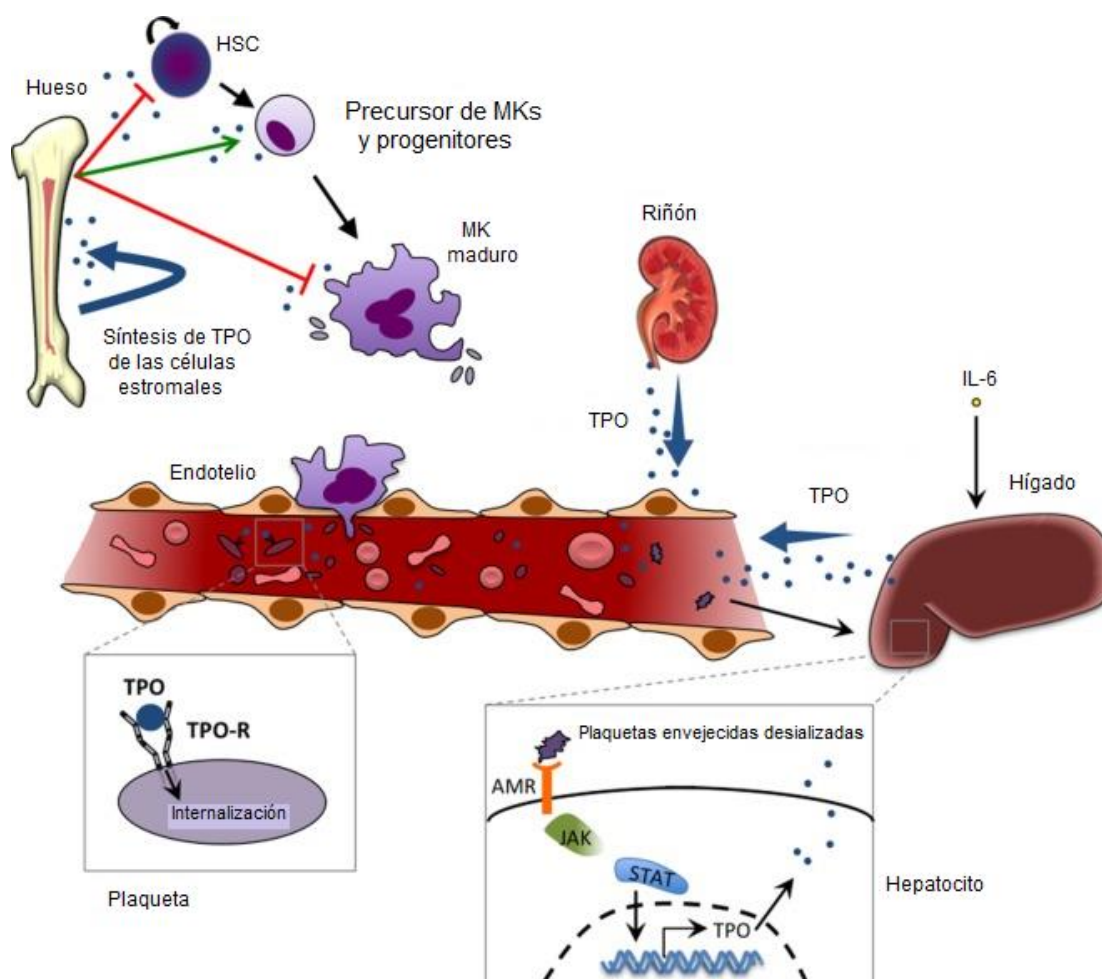


Figura 4. Producción, función y homeostasis de la TPO.

La regulación de la TPO está mediada por retroalimentación negativa del grupo de plaquetas que expresan receptores para la TPO, que internaliza y destruye la TPO libre circulante. La IL-6 puede inducir la producción de ARNm de TPO hepática en la trombocitopenia reactiva/inflamatoria. Se ha demostrado que la unión de plaquetas envejecidas (que han perdido ácido siálico ó desializadas) al receptor hepático de Ashwell-Morell (AMR) promueve la producción de ARNm de TPO hepática. (*Adaptado de Varghese, L.N., et al, 2017*).

El estudio de *Miao Xu et al (2018)* en ratones *knock-out* para la subunidad GPIIb del receptor plaquetario para el FVW (GPIIb^{-/-}) mostró que los niveles de TPO fueron 2-3 veces menores que los del grupo control *wild type*. Esta disminución no se debió al mayor aclaramiento de TPO a través de los receptores Mpl de las plaquetas y de los MKs GPIIb^{-/-}, sino a la menor síntesis hepática de TPO en estos ratones. Además se demostró que la pérdida de ácido siálico de la GPIIb y no de otras GPs de la membrana

plaquetaria, es la causante de la captación de las plaquetas por los receptores AMR del hígado y de la posterior síntesis hepática de TPO (Figura 5) [47].

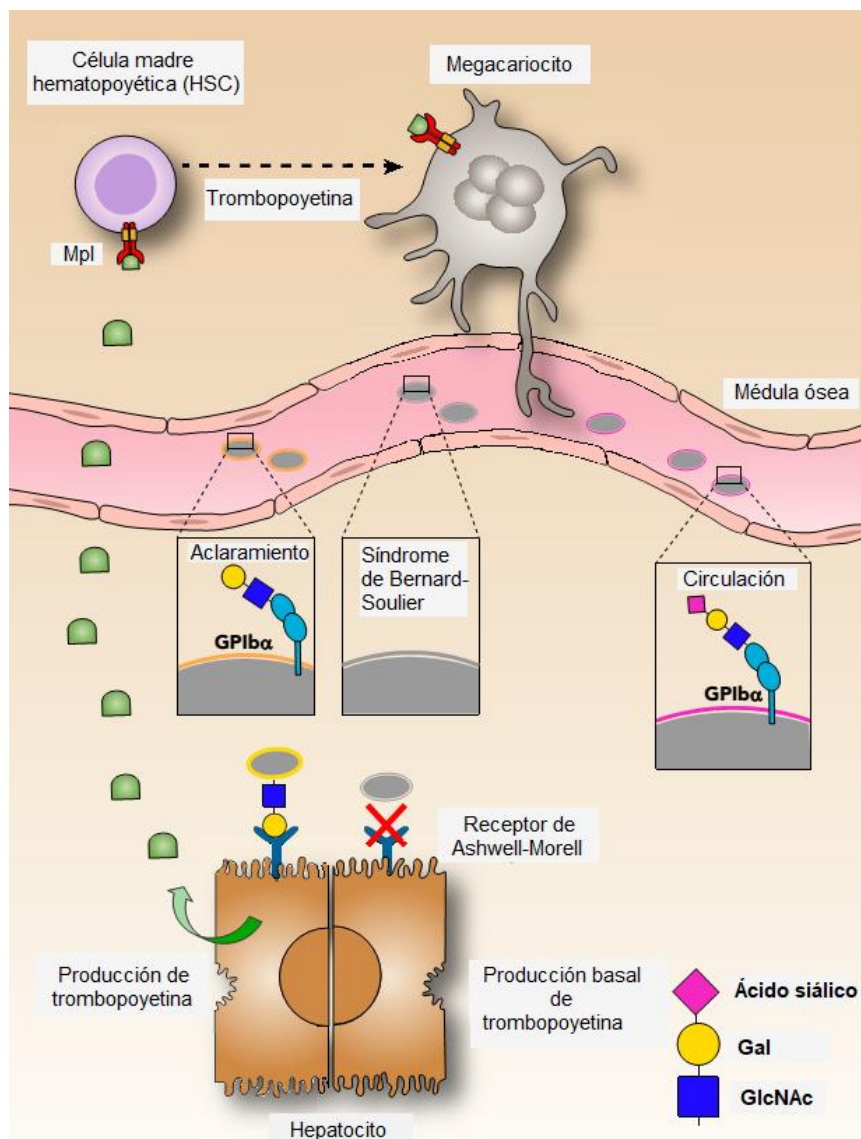


Figura 5. Generación hepática de TPO mediada por la subunidad GPIbα de plaquetas. (Adaptado de *Miao Xu et al*, 2018.)

1.2.4 VIAS DE ACLARAMIENTO Y APOPTOSIS PLAQUETARIA

El organismo humano produce y retira 1×10^{11} plaquetas de forma diaria para mantener un recuento plaquetario estable. El equilibrio fisiológico entre producción y destrucción debe mantenerse para evitar hemorragias espontáneas o la oclusión de vasos y daño tisular.

Las plaquetas son aclaradas de la circulación por vía de degradación de glucanos y mecanismos de apoptosis tras el envejecimiento plaquetario y posterior retirada de la circulación mediante el sistema reticuloendotelial. De esta manera las plaquetas tienen una vida media en la circulación entre 7-10 días [48].

La pérdida de ácido siálico por las plaquetas envejecidas determina su reconocimiento por el receptor de Ashwell-Morell (AMR) en el hígado (un complejo glicoproteico transmembrana heteroligomérico compuesto por dos subunidades ASGPR1 y ASGRPR2). Este AMR es una lectina de la familia de las lectinas tipo C que reconocen y unen asialoglucoproteínas (GPs que han perdido el ácido siálico). Se ha referido que este receptor también participa en la regulación de la hemostasia eliminando al FVW que ha perdido el ácido siálico [49].

La pérdida del ácido siálico se produce por la acción de las sialidasas. Se han descrito en mamíferos hasta 4 sialidasas del tipo neuroaminidasa (Neu 1-4) que hidrolizan los enlaces glucosídicos de los ácidos neuramínicos. En las plaquetas en reposo, la Neu 1 (enzima lisosomal que preferentemente hidroliza el ácido siálico de las GPs) y la β -galactosidasa, residen en múltiples gránulos pequeños dentro de las plaquetas, mientras que la Neu 3 (enzima unida a la membrana plasmática y que hidroliza preferentemente GPs de los gangliósidos) se localiza en la superficie plaquetaria. Cuando las plaquetas envejecen o cuando se refrigeran durante periodos prolongados, la Neu 1 y la β -galactosidasa se detectan en la superficie de la plaqueta, disminuyendo el contenido de ácido siálico de las GPs de la membrana plaquetaria. De este modo, las plaquetas se hacen susceptibles de ser captadas por los AMR. La unión de las plaquetas desializadas al AMR regula la producción de ARN monocatenario (ARNm) de TPO y su posterior síntesis hepática, reclutando JAK2 y STAT3 para aumentar la trombopoyesis, y finalmente aumentar el número de MKs y la producción plaquetaria (Figura 6) [46, 50].

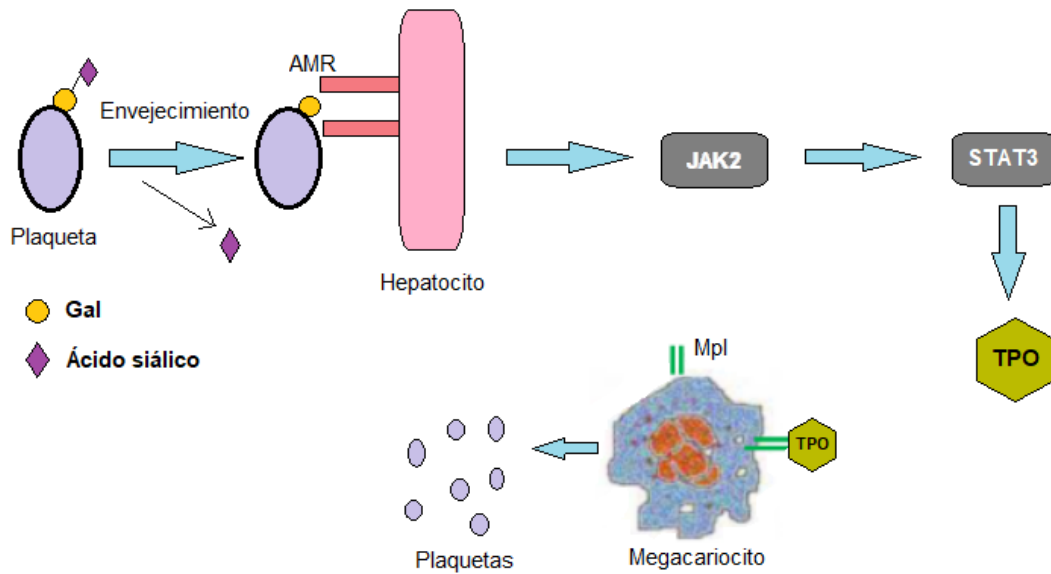


Figura 6. Esquema en el que se representa la producción de TPO vía JAK2-STAT3 después de la unión de plaquetas desializadas al receptor de Ashwell-Morell (AMR). (Adaptado de Grozovsky, R., et al, 2015).

Del mismo modo la apoptosis es una forma de muerte celular programada que juega un papel fundamental en el desarrollo y la homeostasis, ya que se trata de un mecanismo celular de defensa [51]. Existen dos vías apoptóticas: la extrínseca y la intrínseca. Una vez que ambas se activan, finalmente convergen en la activación de caspasas (cisteinil aspartato proteasas) responsables de la muerte celular.

Apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial

Esta vía de apoptosis se basa en la interacción entre miembros de proteínas de la familia Bcl-2 en la mitocondria. Requiere de la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación al citosol de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c, la Smac (del inglés, second mitochondria-derived activator of caspases) y la DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) [52, 53]. El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa 9 y con ello la activación de la cascada de las caspasas. Por otro lado las proteínas mitocondriales Smac y DIABLO se unen y antagonizan el efecto que tiene la familia del inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) [54, 55].

La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las acciones opuestas de los diferentes miembros de la familia Bcl-2. Esta familia consta de 19 miembros que se han clasificado en tres grupos basándose en similitudes estructurales y funcionales. Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados de la familia Bcl-2, denominados dominios de homología con Bcl-2: BH1-BH4 [56].

- Los miembros del grupo I, como Bcl-2 y Bcl-xL, poseen actividad antiapoptótica y se caracterizan por tener los cuatro dominios BH (BH1-BH4).
- Los miembros del grupo II, como Bax y Bak, poseen actividad proapoptótica. Tienen estructura similar a las del grupo I pero carecen del dominio BH4.
- Los miembros del grupo III, como son Bid, Bad, Bim o Bik, también tienen actividad proapoptótica. Todos ellos se caracterizan por la presencia de un único dominio BH3, pudiendo tener o no región transmembrana.

La liberación regulada de factores proapoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras así como una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Figura 7) [57].

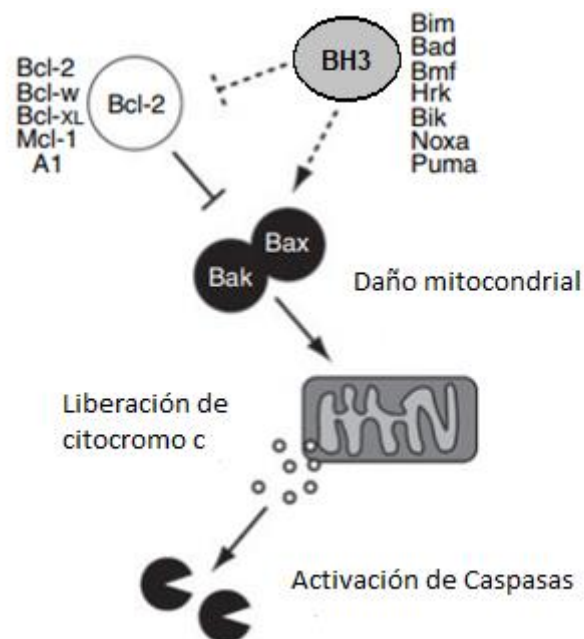


Figura 7. Vía intrínseca o mitocondrial. (Adaptado de Kile, B.T, 2009)

La vía extrínseca

Es la vía alternativa de apoptosis desencadenada por la actuación de ligandos como el Fas-L o el factor de necrosis tumoral TNF- α sobre los receptores transmembrana de las células. De este modo se activan las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas 3, 6 y 7. Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el IAP, que afecta a las caspasas iniciadoras y a las ejecutoras [58, 59].

Proceso apoptótico de MKs y plaquetas mediado por caspasas

Las caspasas son enzimas proteolíticas que se sintetizan y se liberan en el citosol en forma de procaspasas o precursores inactivos. Su forma activa tiene la función de degradar el interior celular llevando a la muerte de la célula.

Hay varios tipos de caspasas, cada una de ellas especializada en actuar sobre diferentes tipos de proteínas. Todas las caspasas rompen cadenas de aminoácidos en lugares donde se encuentra el aminoácido aspartato, no obstante, cada una de ellas actúan sobre diferentes proteínas dependiendo de los aminoácidos adyacentes a dicho aminoácido aspartato. Las caspasas que se activan inicialmente por un proceso autocatalítico son las caspasas 2, 8, 9 y 10 (caspasas iniciadoras), mientras que las efectoras o ejecutoras son las caspasas 3, 6 y 7. Estas últimas pasan a su conformación activa tras la acción proteolítica de las primeras.

Dentro de las caspasas ejecutoras, la caspasa 3 es considerada muy importante puesto que activa a la endonucleasa CAD ó “Caspase-activated DNase”, la cual degrada la cromatina. También afecta a la reorganización del citoesqueleto de la célula, provocando la rotura de la misma en fragmentos celulares independientes [60].

Actividad del proteasoma plaquetario

Estudios recientes han demostrado que existe una relación entre la apoptosis y la actividad del proteasoma plaquetario. El proteasoma, entre otras, elimina a la conformación activa de la proteína proapoptótica Bax, ejerciendo un papel clave en la supervivencia de las plaquetas [61]. El proteasoma 26S, complejo multiproteico responsable de la proteólisis de péptidos ubiquitinados, es la maquinaria de degradación de las proteínas celulares [62]. Este complejo presenta un núcleo catalítico cerrado 20S

(donde las proteínas son degradadas) y dos subunidades reguladoras 19S con múltiples sitios de actividad ATPasa además de sitios de unión a ubiquitina. Por tanto, dicho complejo se encarga tanto de reconocer a las proteínas poliubiquitinadas como de su transferencia al núcleo catalítico, donde estas proteínas serán degradadas.

El proteasoma escinde proteínas intracelulares con el fin de regular procesos celulares tales como el procesamiento de antígenos (Ags), el ciclo celular, así como la transcripción y la transducción de señales [63]. La actividad del proteasoma se reduce de forma constante durante el envejecimiento celular [64], lo que lleva a la acumulación intracelular de proteínas mal plegadas y de la proteína proapoptótica Bax, lo que induciría la muerte celular. Del mismo modo se ha descrito una clara relación entre la actividad del proteasoma plaquetario y la capacidad de activación de las plaquetas, ya que el proteasoma se activa de manera calcio dependiente tras la estimulación plaquetaria [65] y su inhibición reduce tanto la agregación plaquetaria inducida por dosis bajas de trombina como la aglutinación plaquetaria por ristocetina [66].

Micropartículas

Las MPs son vesículas de 0,1 a 1 μm de diámetro formadas por PLs aniónicos, tienen citoesqueleto, pero no núcleo (sin capacidad de síntesis proteica). Están compuestas por una membrana con una capa externa de fosfatidilcolina y esfingomielina, mientras que la capa interna contiene PS y fosfatidiletanolamina, estructura que les confiere estabilidad. Tanto en su membrana como en su interior se expresan proteínas y microARNs correspondientes a la estirpe celular de la que proceden [67]. Las MPs pueden proceder de hematíes, neutrófilos, plaquetas, monocitos, linfocitos y células endoteliales, siendo las más frecuentes las MPs derivadas de las plaquetas (entre un 70-90%).

Todas estas características hacen que las MPs sean mediadores de señalización intercelular y sean liberadas por distintas células sanguíneas o vasculares tras ser sometidas a distintos tipos de estimulación o estrés, activación y/o apoptosis. En las plaquetas, los PLs neutros como la esfingomielina y la fosfatidilcolina expuestos en la membrana externa en situación de reposo cambian en el proceso de generación de MPs derivadas de plaquetas. En este proceso se traslocan a la superficie plaquetaria PLs aniónicos como la PS y la fosfatidiletanolamina, que inicialmente estaban en la capa interna de la membrana. Estos cambios estructurales están bajo el control de tres sistemas enzimáticos: la flopasa, la flipasa y la escramblasa. En situación de reposo sólo está activa la enzima flipasa, cuya función es internalizar los PLs cargados

negativamente y mantener la asimetría de la bicapa lipídica. Cuando se produce la estimulación celular o durante los procesos de apoptosis, aumenta la concentración intracelular de calcio, inactivándose la flipasa y activándose la flopasa y la escramblasa, lo que conlleva una translocación de la PS y otros PLs aniónicos desencadenando la pérdida de simetría de la membrana plaquetaria. Además, se activan las enzimas gelsolina y calpaína responsables de hidrolizar los puentes de actina y debilitar la unión de las GPs de membrana, dando lugar finalmente a la formación de MPs procedentes de plaquetas [68].

En estados fisiopatológicos la sobreexpresión de MPs tiene un papel importante en la trombosis ya que un 25% de la actividad procoagulante se debe a las MPs derivadas de plaquetas [68]. Estas MPs de origen plaquetario contienen subgránulos en su interior que almacenan P-selectina, Fg, factor plaquetario 4 o VEGF. Su capacidad procoagulante probablemente sea debida a la exposición de PS [69] y FT en la superficie de las MPs y a la fusión de éstas con las plaquetas activadas, proceso que requiere de la interacción del ligando glicoproteico 1 de la P -selectina (PSGL-1) de las MPs con la P-selectina plaquetaria.

1.2.5 ANATOMÍA DE LAS PLAQUETAS

Características generales

Las plaquetas en reposo tienen una forma discoidea con los gránulos uniformemente distribuidos. La alta resolución de la microscopía electrónica de barrido sugiere que la membrana plasmática de las plaquetas tiene un aspecto rugoso (Figura 8) [70]. Cuando éstas se activan adoptan una forma esferoidal con centralización de sus gránulos y emisión de pseudópodos (Figura 9 y 10) [71-73].

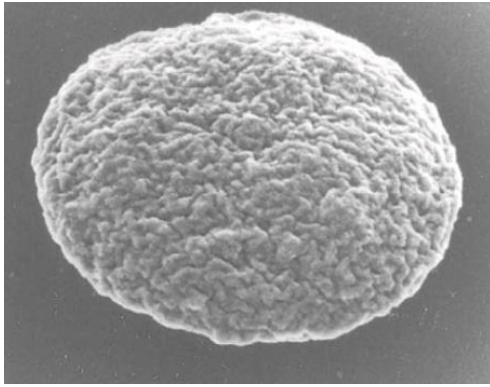


Figura 8. Plaqueta con forma discoidea (estado de reposo) fotografiada en el microscopio electrónico de barrido. El exterior de la célula presenta surcos alternativos que dan una apariencia arrugada. Magnificación $\times 30.000$.

(Imagen extraída de White, J. G., & Escolar, G. 1993).

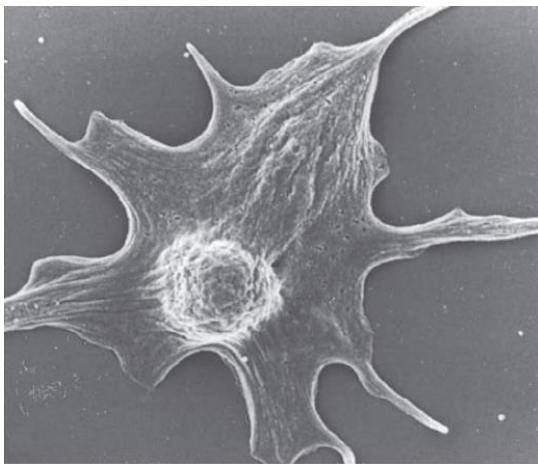


Figura 9. Plaqueta activada, forma esferoidal con emisión de pseudópodos. (Imagen extraída de Behnke, O. 1970.)



Figura 10. Transformación interna de una plaqueta estimulada por trombina. Los orgánulos se concentran en el centro celular. Aumento $\times 30,000$. (Imagen extraída de White, J. G. 1968).

La membrana plasmática de las plaquetas, a diferencia de otras células de la sangre, tiene una capa externa más gruesa llamada glucocálix. La bicapa lipídica de la zona periférica en la que descansa el glucocálix es una membrana que no las hace diferentes en apariencia de la membrana de otras células. No obstante, desempeña un papel único e indispensable en la aceleración de la coagulación, función no compartida por otras células de la sangre circulante [74, 75]. Esta bicapa lipídica es incompresible y no puede estirarse, por tanto, cualquier contribución a la mayor área superficial de las plaquetas debe venir de los pliegues o pseudópodos de la superficie expuesta de la membrana plasmática cuando las plaquetas son activadas.

Características específicas

1. Glucocálix

Además de servir para separar el contenido intracelular de la plaqueta del medio externo, es una estructura dinámica que sirve como el primer sitio de contacto para detectar cambios en el compartimiento vascular, por tanto, facilita la respuesta hemostática de las plaquetas en los sitios de lesión de los vasos.

El glucocálix está cubierto por receptores de GPs necesarios para facilitar la adhesión de las plaquetas a una superficie dañada, desencadenar la activación completa de la plaqueta por acción de los diferentes agonistas de la activación plaquetaria, promover la agregación plaquetaria y la interacción con otros elementos celulares, acelerando el proceso de formación del coágulo [76].

2. Unidad de Membrana

Es una bicapa lipídica morfológicamente similar a las membranas de otras células. Tiene la particularidad de que, en el caso de las plaquetas, juega un papel importante en el proceso de coagulación debido a que se encuentran ancladas sobre esta bicapa las GPs del glucocálix. Igualmente, la membrana posee unas invaginaciones que forma el sistema canalicular abierto (OCS).

El OCS se presenta como una red de vesículas y canales interconectados entre sí, que se ramifican a través de todo el citoplasma y comunican con la superficie celular [77]. Este sistema constituye una vía de acceso de sustancias plasmáticas a lugares más internos de la plaqueta, y durante la activación plaquetaria constituye una reserva de membrana plasmática que permite el cambio de forma y la emisión de pseudópodos. Funciona además como canal conductor hacia el exterior de sustancias liberadas a partir de los gránulos intraplaquetarios en el momento en el que se produce la activación de la plaqueta [78].

3. Área submembrana

Es la zona localizada justo por debajo de la unidad de membrana de la zona periférica de la plaqueta y es de gran importancia en la función plaquetaria. Los dominios citoplasmáticos de los receptores transmembrana interactúan en el área

submembrana con numerosos componentes de las proteínas que regulan los procesos de señalización intracelular que produce la activación plaquetaria (Figura 11) [79].

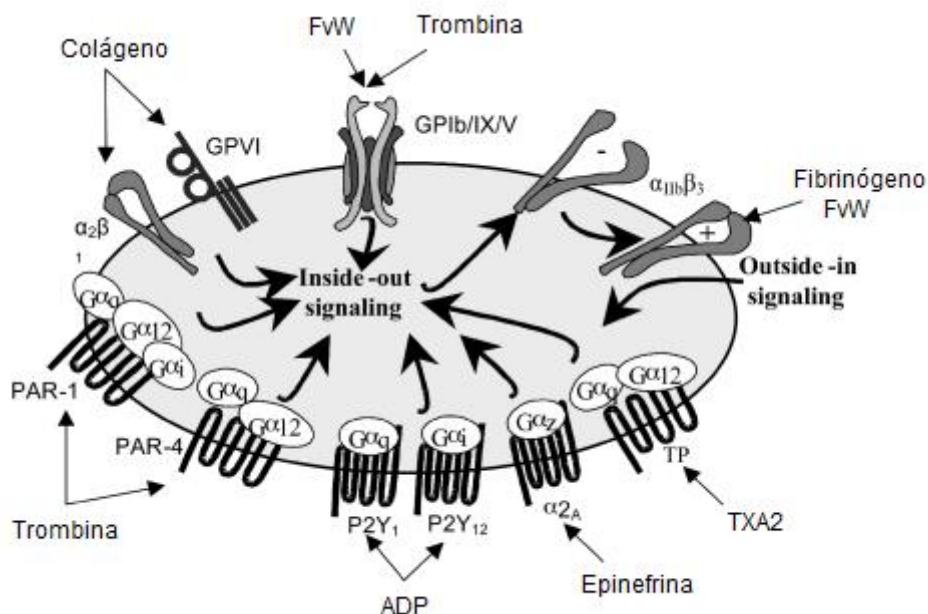


Figura 11. Receptores de plaquetas y señalización. (Imagen extraída de Rivera, J., et al. 2009).

Un número significativo de estas proteínas, incluida la proteína de unión a actina (filamina) unida al complejo GPIb-IX-V y las colas citoplásmicas de GPIIb y GPIIIa, se asocian con la calmodulina, miosina y los filamentos cortos de actina que forman el citoesqueleto contráctil de la membrana plaquetaria. El sistema contráctil de esta zona está involucrado en la translocación de los complejos de los receptores, incluyendo el GPIb-IX-V y GPIIb-IIIa, en la superficie exterior de las plaquetas siendo de gran importancia en los procesos de adhesión y diseminación que tiene lugar en los sitios de lesión vascular [80].

4. Glicoproteínas

Los principales receptores de la superficie plaquetaria implicados en la hemostasia son el complejo de GPIb-IX-V ó receptor plaquetario para el FVW acoplado al

citoesqueleto por una actina (proteína de unión llamada filamina), y la integrina $\alpha\text{IIb-}\beta 3$ ó también llamada complejo GPIIb-IIIa (receptor de Fg).

La integrina $\alpha\text{IIb-}\beta 3$ (GPIIb-IIIa) o receptor de Fg [81] de las plaquetas participa en la formación del trombo al intervenir tanto en la activación plaquetaria como en la posterior adhesión y agregación plaquetaria. Dicho receptor está formado por dos subunidades o colas citoplasmáticas, la GPIIb (integrina αIIb) y la GPIIIa (integrina $\beta 3$), a través de las cuales el complejo GPIIb-IIIa se une al citoesqueleto. La cuantificación de la expresión del receptor de Fg mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (mAc), ha revelado que cada plaqueta expresa de media aproximadamente 80.000 receptores de Fg por superficie [82, 83]. Este receptor no es exclusivo de las plaquetas ni selectivo únicamente para el Fg, ya que también se encuentra en MKs y en alguna otra célula transformada. Además de unir Fg, este receptor tiene la capacidad de unirse a otros ligandos solubles como el FVW [84, 85]. La activación plaquetaria por los agonistas (ADP, colágeno, epinefrina o trombina) provoca un cambio conformacional del receptor de Fg, lo que produce un aumento en la afinidad por el Fg soluble y otras proteínas como fibronectina y FVW presentes en plasma, siendo el Fg el principal mediador de la agregación plaquetaria.

Una vez que la plaqueta ha sido activada por los diferentes agonistas y se han desarrollado las diferentes vías de transducción de señales, se producen señales de origen intracelular o *inside-out* que provocan un cambio estructural en el receptor del Fg, lo que provoca el aumento de afinidad por el ligando. Una vez que se ha unido el Fg al receptor se inicia un proceso de señalización *outside-in* que genera la agrupación de integrinas y la formación de contactos focales que promueven cambios en la morfología y la adhesión plaquetaria (Figura 12).

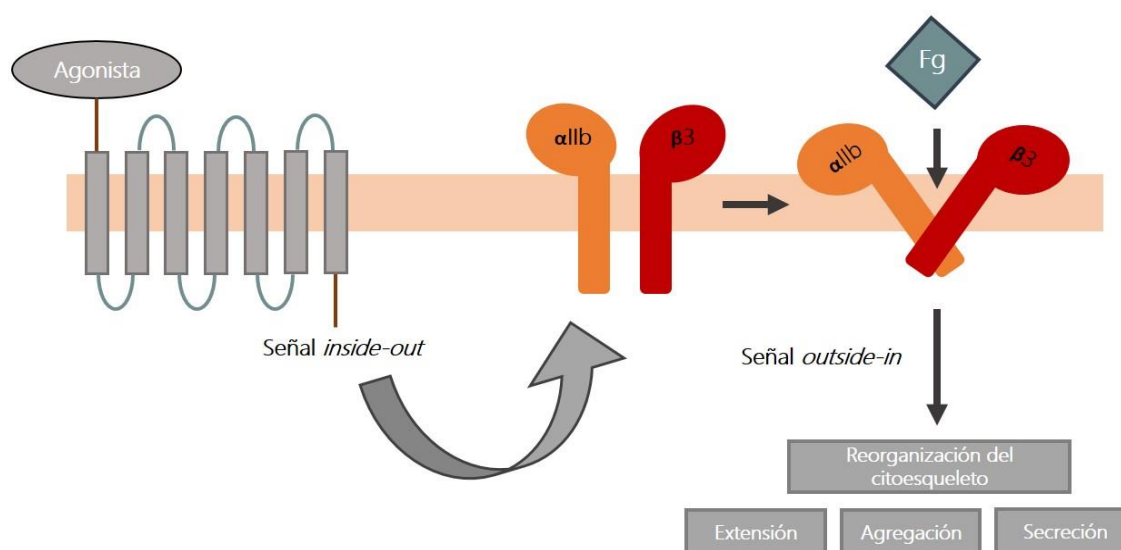


Figura 12. Cambios conformacionales del receptor del Fibrinógeno. Los agonistas activan al receptor de Fg plaquetario (señal *inside-out*), se une Fg con alta afinidad y se generan señales del exterior al interior de la célula (señal *outside-in*). Como consecuencia se activan numerosos procesos en cascada hasta producir la agregación y adhesión plaquetaria, la secreción de sustancias proactivas y la extensión del cuerpo celular para la emisión de pseudópodos (plaqueta activa).

El receptor GPIb-IX-V ó GPIb es un complejo multiproteico constituido por 4 diferentes tipos de GPs: la GPIb α y GPIb β (unidas entre sí por puentes disulfuro), y la GPIX y GPV (asociadas mediante uniones no covalentes). Este receptor es fundamental para la unión inicial de las plaquetas a la matriz extracelular y su adhesión al vaso dañado. Esta unión se realiza a través del FVW, que actúa como puente entre el colágeno subendotelial (expuesto por la lesión del vaso) y los receptores GPIb presentes en la membrana plaquetaria. El síndrome de Bernard-Soulier es un desorden autosómico recesivo que aparece como consecuencia de una ausencia o disminución de las GPs que forman el receptor GPIb [79].

Otras de las principales GPs presentes en la superficie plaquetaria aparte de las ya mencionadas son la GPIa-IIa y la GPVI (receptores del colágeno), y la GPIV (receptor de la trombospondina y del colágeno), junto a otras recogidas en la Tabla 1.

Nomenclatura	Ligando	Designación clúster
GP1a-IIa (Integrina $\alpha 2\beta 1$)	Colágeno tipo I y IV	CD29, CD49b
GP1c-IIa (Integrina $\alpha 6\beta 4$)	Laminina	CD29, CD49e
GP1c-IIa (Integrina $\alpha 5\beta 1$)	Fibronectina	CD29, CD49f
GP1V (Receptor plaquetario mixto)	Colágeno II y Trombospondina	CD36
GPVI (MAC del gen de la familia de la Ig)	Colágeno	-
GP1b-IX-V (MAC ricas en leucina)	FVW y Trombina	CD42a (GP1X), CD42b (GP1b α), CD42c (GP1b β) y CD42d (GPV)
GP1Ib-IIIa (α IIb- β 3)	FVW y Fibrinógeno	CD41 y CD61

Tabla 1. GPs de la membrana plaquetaria que participan en la adhesión y en el inicio de la agregación con sus ligandos correspondientes. MAC (Molécula de adhesión celular).

Sobre estos receptores actúan los agonistas solubles como son la trombina, el adenosín difosfato (ADP), el tromboxano A₂ (TXA₂) y la epinefrina (EPI). La trombina es el agonista plaquetario más potente y es responsable de facilitar la producción de fibrina a partir de Fg. Los receptores activados por la proteasa (PAR) son los receptores de la trombina y el mecanismo de activación de éstos y las señales que los estimula son complejos, no obstante, los PAR no son exclusivamente de expresión plaquetaria.

La trombina es una enzima que puede activar a más de una molécula del receptor PAR. Al unirse la trombina al receptor, ocurre una liberación proteolítica en la molécula del receptor, lo que produce la activación de cuatro tipos diferentes de proteínas G que desencadenan diferentes señales en la célula [86], entre ellas la activación plaquetaria. Hasta la fecha se han descrito cuatro subtipos diferentes de PAR. De ellos, solamente el PAR-1 y el PAR-4 se expresan en las plaquetas humanas y ambos estimulan la agregación y la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios [87].

El PAR-1 es el receptor principal de trombina en las plaquetas y produce la activación de la plaqueta con concentraciones bajas de trombina (50 pM), mientras que PAR-4 necesita concentraciones de trombina mayores (5.000 pM). Algunos estudios proponen que el PAR-1 actúa como cofactor de la activación por trombina del PAR-4, por lo que el PAR-1 y el PAR-4 actuarían como un único complejo [88]. No obstante, los estudios preclínicos indican que la inhibición del receptor PAR-1 es suficiente para la prevención del evento trombótico [89].

5. Receptores Fcγ-RIIa

Las plaquetas humanas expresan Fcγ-RIIa, el receptor de baja afinidad para el fragmento constante (Fc) de la inmunoglobulina (Ig) G ó FcIgG, que también se encuentra en neutrófilos, monocitos y macrófagos. El receptor Fcγ-RIIa es una proteína transmembrana tipo I de aproximadamente 40 kDa. Consta de dos dominios extracelulares tipo Ig [90, 91], un dominio transmembrana y una cola citoplasmática que porta un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) con secuencias consenso de aminoácidos dobles [92].

El compromiso de este receptor plaquetario por los complejos inmunes patológicos de la enfermedad subyacente desencadena in vivo eventos de señalización intracelular que conducen a la activación y agregación de las plaquetas [93], además de la liberación de numerosos mediadores implicados en la amplificación de la respuesta a este nivel [94, 95]. De este modo las interacciones específicas entre bacterias y plaquetas a través del receptor Fcγ-RIIa han sido detalladas recientemente en numerosas revisiones [94, 96-98], poniendo de manifiesto la implicación que tienen las plaquetas en la respuesta innata.

6. Sistema tubular denso

El sistema tubular denso (STD) se presenta al microscopio electrónico como un conjunto de tubos apretados y cortos que forman una red continua por todo el citoplasma, adquiriendo una mayor densidad en la periferia que en el centro de la célula.

El STD, gracias a la presencia en sus membranas de un transportador de Ca^{2+} tipo SERCA, constituye el principal lugar de almacenamiento del Ca^{2+} intraplaquetario, regulando la concentración de Ca^{2+} citoplasmático libre en la plaqueta. Este

transportador es esencial para mantener los microtúbulos en la forma polimerizada y la forma discoidea de la plaqueta en reposo, estado que requiere una baja concentración citoplasmática de Ca^{2+} . Durante la activación de la plaqueta se desencadena una reacción que estimula la membrana de este sistema para liberar Ca^{2+} intracelular, dando como resultado la redistribución de los complejos GPIIb-IIIa en la superficie plaquetaria, la reorganización del citoesqueleto y la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios al medio extracelular [99-101].

7. Gránulos intraplaquetarios

Una característica importante de las plaquetas es el gran número de moléculas biológicamente activas que se almacenan en sus gránulos, las cuales se distribuyen con precisión en los sitios de lesión vascular y promueven el reclutamiento de otras células sanguíneas. En las plaquetas en reposo, los gránulos se colocan cerca de la membrana del OCS, mientras que durante la activación plaquetaria se produce la secreción del contenido de los gránulos al medio extracelular al fusionarse la membrana de los gránulos intraplaquetarios con la membrana plasmática del sistema OCS [102].

- **Gránulos α :** son los más abundantes (aproximadamente 50-80 gránulos α por plaqueta), su tamaño varía desde 200 a 500 nm, constituyen un 10% del total del volumen plaquetario y son ricos en macromoléculas diversas como el factor 4 plaquetario, Fg, fibronectina, FVW, PAI-1, trombospondina, β -trombomodulina, P-selectina, CD63 y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento *insulina-like* (IGF-1) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [103, 104].

Sus membranas contienen GPIIb-IIIa [105], pequeñas cantidades de GPIb, GPIX y P-selectina, por lo que ejercen un papel importante en la adhesión plaquetaria. Tienen una importante participación en el funcionamiento celular y en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido al medio extracelular. Su contenido contribuye a la hemostasia primaria y secundaria ya que, junto a otras proteínas adhesivas, median las interacciones plaqueta-plaqueta y plaquetas-endotelio [103, 106]. Igualmente los gránulos α contienen una serie de factores de coagulación y cofactores como son los factores V, XI y XIII, que se secretan tras la activación plaquetaria y que participan en la hemostasia secundaria [107].

- **Gránulos densos:** se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confieren el elevado contenido en calcio y fósforo inorgánico de su interior [108]. Los gránulos densos intervienen en el reclutamiento adicional de plaquetas en los sitios donde tiene lugar el daño vascular al liberar al medio extracelular (por exocitosis) una gran variedad de moléculas hemostáticamente activas, incluyendo catecolaminas, serotonina, calcio, ADP y adenosina 5'-trifosfato (ATP). El ADP es un agonista de plaquetas débil, que desencadena cambios de forma de las plaquetas, liberación del contenido granular y agregación plaquetaria [109].

Los gránulos densos contienen las proteínas de membrana lisosomal CD63 y LAMP-1 / 2 [110], pero también proteínas no lisosómicas tales como la P-selectina, la GPIIb e integrina α IIb β 3 [110]. Igualmente los gránulos densos contienen rab27a y b [111, 112], dos pequeñas GTPasas requeridas para la liberación del contenido de los gránulos al medio extracelular.

- **Lisosomas:** los lisosomas plaquetarios contienen en su interior mayoritariamente hidrolasas ácidas (catepsinas, hexosaminidasa, β -galactosidasa, arilsulfatasa, β -glucuronidasa y fosfatasa ácida), y de forma similar a los gránulos densos, expresan CD63 y LAMP-1 / 2 [113].

Aunque las funciones de los lisosomas plaquetarios no se han estudiado de forma detallada, desempeñan un papel fundamental en la digestión de los componentes fagocíticos y citosólicos de las plaquetas. Del mismo modo, la secreción del contenido lisosomal al medio extracelular puede tener funciones extracelulares importantes, tales como favorecer la escisión y reciclaje de receptores, la fibrinólisis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular junto a la remodelación del lecho vascular [113].

Aunque se desconoce el mecanismo por el que se produce, parece que los lisosomas plaquetarios pueden contribuir a un proceso celular típico de las células nucleadas denominado "secreción no convencional" [114]. Esta forma de secreción lisosomal favorecería el proceso de autofagia, que parece estar activa en la plaqueta en momentos de inanición [115].

- **Gránulos T:** recientemente, se ha identificado un nuevo tipo de gránulo secretor, denominado gránulo T, así llamado debido a su morfología tubular. Éstos contienen en su interior TLR9, PDI y VAMP-8 [116]. Resultado de la estimulación plaquetaria con colágeno tipo IV, se aumenta la expresión superficial de TLR9, posiblemente a través de las proteínas VAMP-8 y VAMP-7. Se ha demostrado que la PDI es liberada

en las plaquetas activadas [117, 118] y que el aumento de su expresión contribuye a la formación de trombos plaquetarios [119].

1.3 HEMOSTASIA

1.3.1 INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un mecanismo de defensa del organismo que, tras sufrir un traumatismo o lesión, previene la pérdida de sangre del interior de los vasos sanguíneos deteniendo la hemorragia mediante mecanismos fisiológicos.

Se divide en dos fases (hemostasia primaria y secundaria), seguidas del proceso de fibrinólisis [120]:

- **Hemostasia primaria:** las plaquetas se adhieren a la superficie lesionada y se agregan para constituir el “tapón hemostático plaquetar”.
- **Hemostasia secundaria:** en esta fase la activación de diversas proteínas del plasma produce la formación de un coágulo de fibrina que impide la salida de sangre al exterior.
- **Fibrinólisis:** proceso específico de disolución de fibrina por proteasas sanguíneas.

1.3.2 HEMOSTASIA PRIMARIA

La activación plaquetaria

Para que ocurra el proceso de activación plaquetaria se requiere una serie de condiciones que lo favorezcan [121, 122]:

- La existencia de disfunción endotelial (lesión vascular), debida a un traumatismo o lesión.
- Alteraciones en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas.
- Proceso de inflamación crónico que modifique la funcionalidad de la pared vascular.

Todo esto produce un estrés oxidativo que cambia la estructura y la actividad de las lipoproteínas de las plaquetas y promueve su activación. El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas:

1. Detención de las plaquetas circulantes sobre la pared vascular dañada.
2. Activación y adhesión de la plaqueta a la pared del vaso dañado.
3. Unión de más plaquetas a las ya adheridas (fase de crecimiento del trombo).
4. Estabilización del trombo.

En estado de reposo las plaquetas circulantes no interactúan entre ellas ni con la pared del vaso. Cuando se produce la lesión de la pared vascular se produce la exposición desde la matriz subendotelial de diferentes sustancias implicadas en la activación plaquetaria como son el colágeno, el FVW, el ADP o la trombina. La GPIb α de la superficie de la plaqueta inicia el proceso de adhesión plaquetaria ya que se une al colágeno expuesto tras la rotura del endotelio vascular y al dominio A1 del FVW circulante, logrando reducir el flujo rápido de las plaquetas. Esta interacción transitoria entre el FVW y la GPIb α permite la «rodadura» de las plaquetas en la zona dañada del vaso. Como resultado, las proteínas contenidas en la pared vascular inducirán la activación de las plaquetas y su adhesión firme a la pared del vaso dañado. De esta manera, el colágeno y el FVW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del trombo, en la que el FVW contribuye a la captura inicial de las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que se establezca una unión más estable con éstas. En el proceso de interacción entre la plaqueta y el colágeno además participan dos receptores plaquetarios, la GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$. La activación de las plaquetas mediada por GPVI permite una adhesión estable de las plaquetas y a su vez la secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en las propias plaquetas. De este modo se logra que el trombo aumente y se consolide.

Una vez producida la unión de las plaquetas al colágeno tiene lugar la expresión de PS sobre la superficie plaquetaria. Esta PS expuesta en la membrana plaquetaria permitiría el anclaje del complejo protrombinasa (FVaXa) y factores de coagulación, que a su vez inducirán un aumento en la generación de trombina [123]. Tras la adhesión inicial de las primeras plaquetas al lugar de la lesión tiene lugar la agregación plaquetaria, es decir, el reclutamiento de nuevas plaquetas desde la circulación a la zona de la lesión. Este proceso es posible gracias a la acumulación local de agonistas responsables de la activación de las plaquetas (ADP, TXA₂, EPI y trombina), secretados por las propias

plaquetas ya adheridas a la pared del vaso dañado. El receptor de Fg ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) activado, posibilita la unión del Fg con alta afinidad y permite establecer puentes estables entre las plaquetas.

El TXA₂ es una molécula sintetizada en la plaqueta como consecuencia de la liberación de ácido araquidónico por la acción de la fosfolipasa A₂ [124]. El ácido araquidónico es el sustrato de la ciclooxygenasa-1 (COX-1), enzima que produce endoperóxidos cíclicos de las prostaglandinas PGG₂ y PGH₂ como productos iniciales. Estos productos se transformarán en TXA₂ por la actividad de la TXA₂ sintasa. El TXA₂, además de activar más plaquetas, es capaz de contraer las células del músculo liso vascular, facilitando en ambos casos el desarrollo del tapón plaquetario.

El ADP liberado por los gránulos densos de las plaquetas, células endoteliales y eritrocitos contribuye también a la propagación de la activación de las plaquetas. Esto es así ya que el ADP, mediante su unión a los receptores plaquetarios P₂Y₁₂, inhibe la adenilato ciclasa y reduce la formación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) en la plaqueta, lo que facilita su activación. Del mismo modo el ADP, por su unión a los receptores P₂Y₁ de las plaquetas, produce la activación de la fosfolipasa C. Estos dos receptores (P₂Y₁₂ y P₂Y₁) están acoplados a las proteínas G_q y G_i respectivamente, lo que tiene gran importancia en el efecto del ADP sobre las plaquetas ya que ambos receptores actuarían de forma sinérgica en la activación plaquetaria [125]. El P₂Y₁ probablemente sea lo que origina la activación inicial reversible, mientras que el P₂Y₁₂ es necesario para la activación prolongada y la agregación plaquetaria.

La etapa final del proceso es la estabilización del tapón plaquetario. En el proceso de estabilización participan también otras moléculas, quizá una de las de mayor interés sea el CD40 ligando (CD40L). El CD40L es una GP almacenada en los gránulos plaquetarios que, tras la degranulación plaquetaria, se expone en la superficie de la misma. El CD40L se libera desde la superficie plaquetaria al plasma mediante la actividad de la metaloproteasa-2 [126] y en ciertas condiciones patológicas por acción de la metaloproteasa-9 [127, 128]. Tanto el CD40L unido a la plaqueta como el CD40L soluble en plasma interaccionan con el CD40 expresado en los linfocitos B, neutrófilos, monocitos, otras plaquetas, células endoteliales, células dendríticas (CDs), fibroblastos y las células de músculo liso vascular, entre otras. La interacción del CD40L de la plaqueta con el CD40 de las células endoteliales estimula la expresión y la liberación de moléculas asociadas al proceso inflamatorio [121], reduce la capacidad de éstas de liberar óxido nítrico y aumenta el estrés oxidativo [129].

Así, el CD40 es una GP de membrana fosforilada que pertenece a la superfamilia del receptor del TNF [130-132] y que juega un papel importante tanto en la inmunidad adaptativa como en la inflamación. Mientras que el CD40L se expresa principalmente en células T activadas [133], las plaquetas expresan tanto CD40 como CD40L [134-137], destacando el papel de este último como potenciador de la agregación plaquetaria *in vitro* [136, 138]. Se ha demostrado que el CD40L soluble recombinante se une específicamente a la GPIIb-IIIa integrina purificada y activa a las plaquetas de una manera dependiente de $\beta 3$ [139]. Sin embargo, el aumento en la activación de $\alpha IIb\beta 3$ causado por el CD40L soluble fue desencadenado por el bloqueo de los Acs anti CD40 y CD40L [136]. Estos datos sugieren que la activación plaquetaria potenciada por CD40L también requiere de la interacción CD40-CD40L. Además de su papel en la trombosis, el CD40L derivado de plaquetas desempeña un papel en el desarrollo de la aterosclerosis mediante la inhibición de la migración de las células endoteliales inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular [140].

1.3.3 HEMOSTASIA SECUNDARIA

Este proceso tiene como principal objetivo favorecer la estabilidad del tapón plaquetario inicial. Esto es posible gracias a la formación de una malla de fibrina o coágulo que recubre el tapón plaquetario generado previamente. Las vías implicadas en la formación del coágulo de fibrina son la vía extrínseca e intrínseca de la coagulación. Ambas vías convergen (a nivel del factor X activado ó FXa) en una vía común implicada en la formación del coágulo y en las que van a intervenir unas proteínas llamadas factores de la coagulación.

Cuando se produce la lesión vascular el proceso de coagulación es iniciado *in vivo* por el FT, expresado en las células del subendotelio en condiciones basales, a través de una vía conocida como la vía extrínseca de la coagulación (debido a la localización extravascular del FT). Sin embargo, en ciertas circunstancias existen otras fuentes de FT que activan la coagulación. De este modo, tanto las células endoteliales como los monocitos, podrían exponer FT en su superficie celular como respuesta a diferentes estímulos de naturaleza proinflamatoria [141, 142]. Igualmente el FT puede estar asociado a las MPs circulantes, cuyas células de origen expresan también FT en su superficie [143]. Está descrito que las MPs procedentes de monocitos pueden interactuar a través del ligando PSGL-1 con la CD62P de las plaquetas o de las células

endoteliales activadas, favoreciendo la activación de la coagulación por la vía extrínseca en sitios donde no existe una pérdida de la integridad de la pared del vaso [144].

Para referirnos a la teoría celular de la coagulación, la dividimos en tres fases (fase de inicio, amplificación y propagación). En la fase de inicio de la coagulación, el FT expuesto en la superficie celular, se une a las trazas de FVII activado (FVIIa), que en condiciones basales se encuentra en concentraciones muy bajas en el torrente sanguíneo. A continuación, el complejo FVIIa-FT activa pequeñas cantidades de FX y FIX. El FX activado obtenido (FXa) activaría pequeñas cantidades de FV, que junto al FV activado (FVa) liberado por las plaquetas activadas (aproximadamente el 25% del FV proviene de plaquetas), favorece la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa). A su vez, el complejo protrombinasa actuaría sobre la protrombina (FII) para generar pequeñas cantidades de trombina (FIIa) (Figura 13).

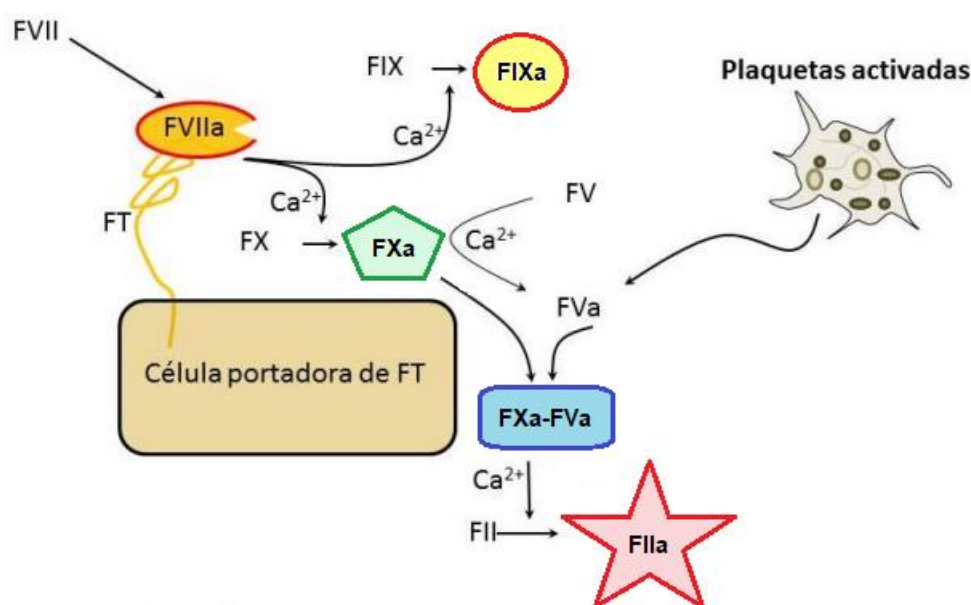


Figura 13. Vía extrínseca de la coagulación. Fase de iniciación. (Imagen extraída de Tesis Doctoral de Ihosvany Fernández Bello 2014. Estado protrombótico de la enfermedad de Behçet: Caracterización de la hemostasia mediante técnicas globales y estudio del papel proinflamatorio de las plaquetas).

A lo largo de este proceso, toda molécula de FXa que abandona la superficie celular donde se ha formado, rápidamente será inactivada ya sea por la AT-III o por el inhibidor de la vía del FT ó TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*), evitando que se active la coagulación más allá de la zona afectada. Mediante este mecanismo la cantidad de

trombina generada no es suficiente para la formación de un coágulo estable, por lo que su producción tendrá que ser amplificada.

Una vez que la sangre entra en contacto con una superficie cargada de forma negativa (sulfato de dextrano, caolín, vidrio, etc.) se produce la activación de la coagulación. A esta vía de activación se le conoce como vía intrínseca de la coagulación o vía de activación por contacto (Figura 14). El sistema de activación mediante la vía de contacto se utiliza para el estudio *in vitro* de la cascada de la coagulación, no obstante, la contribución de esta vía a los mecanismos hemostáticos no es significativa en condiciones fisiológicas [145].

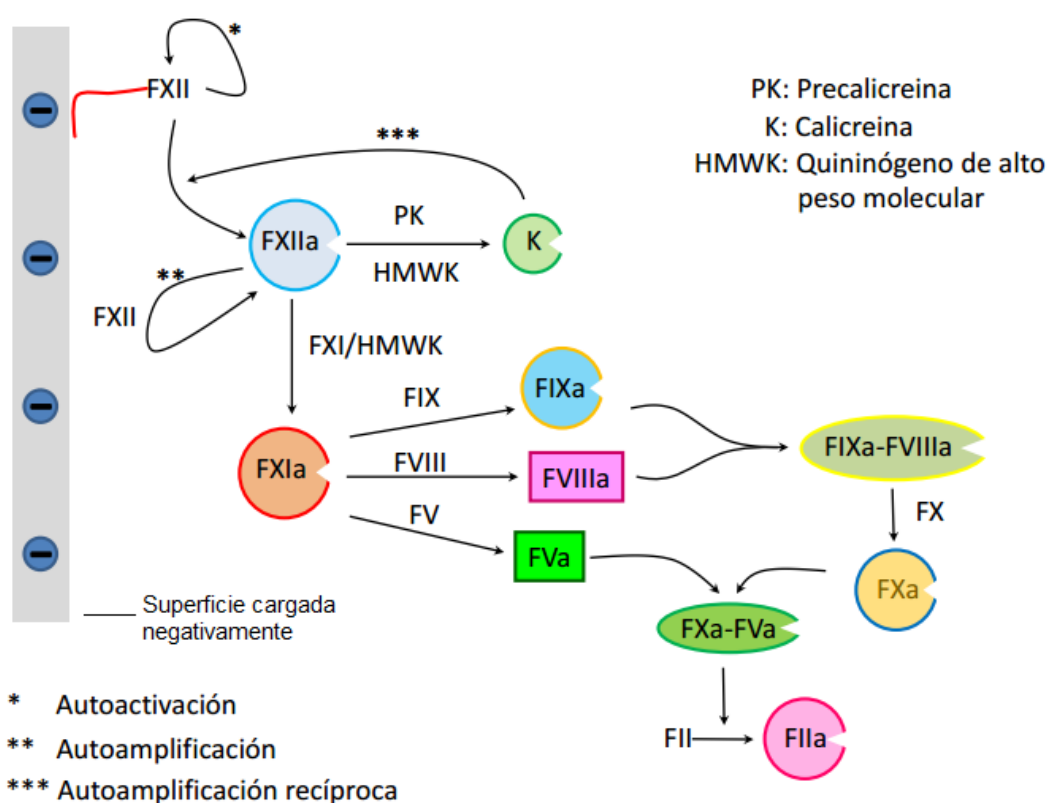


Figura 14. Mecanismos que participan en la vía de activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación. (Imagen extraída de Tesis Doctoral de Ihosvany Fernández Bello 2014. Estado protrombótico de la enfermedad de Behçet: Caracterización de la hemostasia mediante técnicas globales y estudio del papel proinflamatorio de las plaquetas).

En el mecanismo de activación por la vía de contacto participan dos zimógenos, el FXII y la precalicreína (PK), y un cofactor, el quiníngeno de alto peso molecular (HMWK) en un proceso independiente de Ca^{2+} . En el inicio de la activación por la vía de contacto, el FXII (a través de sus dominios ricos en residuos de lisina de carga positiva) se une a una superficie cargada negativamente [146, 147]. Dicha unión provoca un cambio conformacional en la molécula de FXII que conduce a su propia autoactivación a FXIIa [148, 149] y hace al FXII más susceptible a la acción proteolítica de la calicreína (K) [150]. El FXIIa transforma a la PK unida a la superficie en un complejo con el HMWK para producir K [151], y la K a su vez activaría a nuevas moléculas de FXII en un proceso denominado “amplificación recíproca”. El FXIIa puede activar a su vez a nuevas moléculas de FXII en un proceso conocido como “autoamplificación” [152, 153]. Por último, el FXIIa activa al FXI que se encuentra unido a la superficie mediante un complejo formado con el HMWK. A partir de este momento, los mecanismos procoagulantes que intervienen en la generación de trombina a través del FXIa no se conocen al detalle. Se hipotetiza que en un paso posterior, el FXIa activa al FIX y el FIXa generado por esta vía activaría al FX, que produciría a su vez pequeñas cantidades de trombina que desencadena la fase de amplificación. No obstante existen datos que indican que el FIXa posee una actividad catalítica muy limitada en ausencia de su cofactor (el FVIIIa), siendo poco probable que pueda producir suficiente FXa que permita la generación de trombina necesaria para la obtención de un tiempo de tromboplastina parcial activada normal [154, 155]. En contraste con lo anterior, existen datos recientes que indican que el FXIa es capaz de activar pequeñas cantidades de FVIII y FV lo que favorecería la producción de cantidades suficientes de los complejos tenasa (FIXa-FVIIIa) y protrombinasa (FXa-FVa), permitiendo la generación de cantidades importantes de trombina que dieran paso a la fase de amplificación [156]. En la fase de amplificación (Figura 15), las pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de iniciación, estimula a que nuevas plaquetas lleguen al sitio de la lesión y activen en su superficie pequeñas cantidades de FVIII, FV y FXI. La activación del FVIII libera a su vez FVII del complejo FVIII-FVII contribuyendo a la activación y al reclutamiento plaquetario adicional en la zona afectada. Las plaquetas activadas en el sitio de la lesión ofrecen una superficie procoagulante que inducirá la producción de elevadas concentraciones de trombina, necesarias para la formación de un tapón hemostático estable durante la fase de propagación.

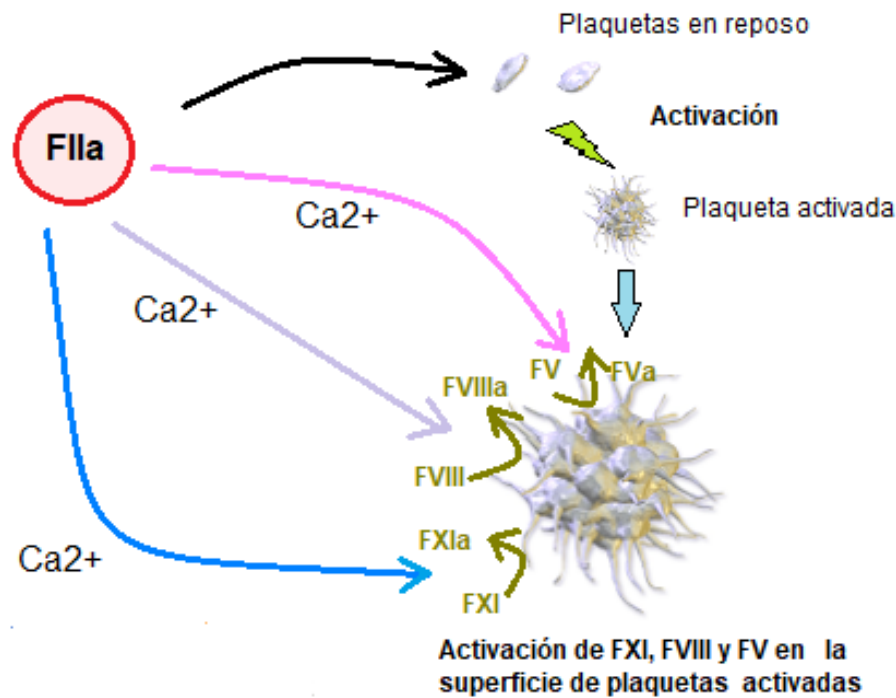


Figura 15. Fase de amplificación de la coagulación.

En la fase de propagación se establece un sistema de retroalimentación positiva que induce la obtención de grandes cantidades de trombina ó “explosión de trombina”. En una primera etapa las cantidades de FIXa y FVIIIa originadas en las fases previas se anclan en la superficie de las plaquetas activadas con la participación de iones de Ca^{2+} , dando lugar al complejo tenasa (FIXa-FVIIIa), que genera elevadas concentraciones de FXa. El FXa originado se une a su vez al FVa en la superficie de plaquetas activadas, también con la participación de iones de Ca^{2+} , para formar el complejo protrombinasa (FXa-FVa) que dará lugar a la formación de una mayor cantidad de trombina. La trombina generada actuaría a su vez sobre nuevas moléculas de FX, FV, FIX y FVIII para producir los correspondientes factores en estado activado (FXa, FVa, FIXa, FVIIIa), completando el mecanismo de retroalimentación positiva del sistema (Figura 16).

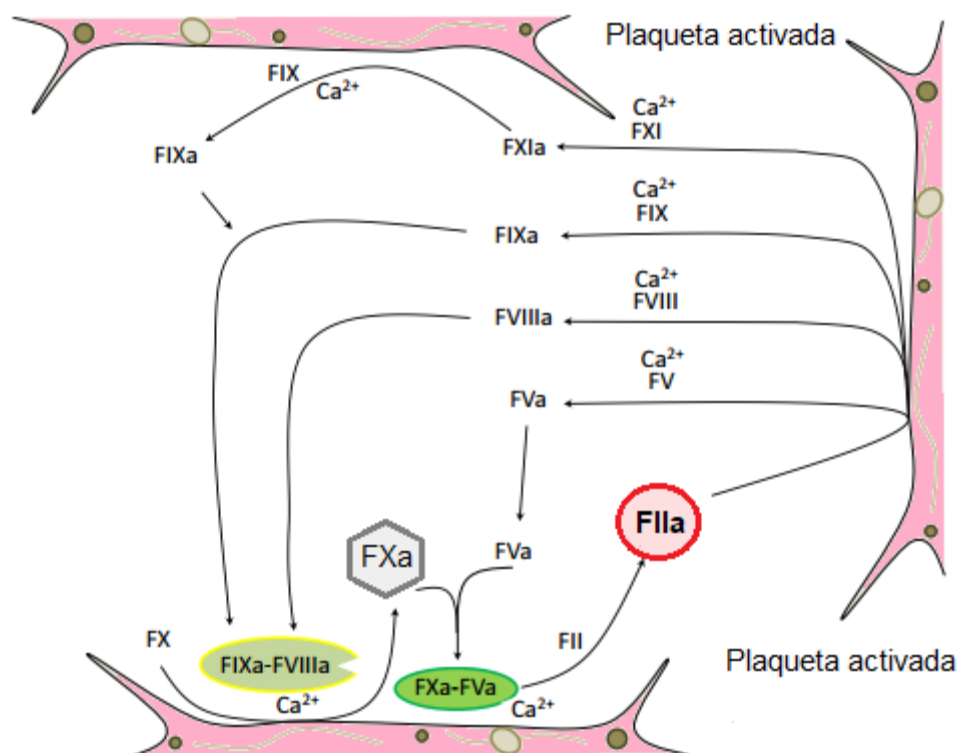


Figura 16. Fase de propagación de la coagulación. (Imagen extraída de Tesis Doctoral de Ihosvany Fernández Bello 2014. Estado protrombótico de la enfermedad de Behçet: Caracterización de la hemostasia mediante técnicas globales y estudio del papel proinflamatorio de las plaquetas).

La trombina generada, el FXIII y el Fg son las moléculas principales implicadas en la etapa final de la coagulación [157]. En una primera etapa hacia la formación de la malla de fibrina insoluble, la trombina actúa mediante proteólisis parcial sobre el Fg, liberando a los fibrinopéptidos A y B. De este modo se induce la generación de moléculas de fibrina que polimerizan de forma espontánea mediante enlaces no covalentes. A este nivel es importante señalar que la trombina tiene un sitio de unión a la fibrina, protegiendo a esta última de sus inhibidores naturales, a la vez que conserva su actividad catalítica. Este hecho permite mantener un potencial procoagulante en las zonas adyacentes a las fibras de fibrina en formación, lo que favorecería el fortalecimiento del coágulo. Como la polimerización espontánea de la fibrina se produce mediante enlaces no covalentes, es necesaria la estabilización de la estructura a través de la participación del FXIII, cuya función catalítica es activada por la trombina [158]. Así el FXIIIa produce un entrecruzamiento entre las fibras poliméricas de fibrina mediante enlaces covalentes, permitiendo la obtención de una malla de fibrina estable [159]. La retracción del coágulo

producida gracias a la labor del sistema contráctil de la plaqueta y a la interacción entre los polímeros de fibrina y la subunidad $\alpha\text{IIb}\beta 3$ presente en la superficie plaquetaria, contribuye a la impermeabilización del coágulo y al aumento de su resistencia al flujo sanguíneo.

1.3.4 FIBRINOLISIS

Definición

El sistema de la fibrinólisis es una cascada enzimática que consta de una serie de activadores e inhibidores que regulan la conversión del plasminógeno en plasmina. La generación de plasmina libre en la superficie del trombo conduce a la eliminación proteolítica de la fibrina, dando lugar a los productos de degradación de la misma y a la degradación a su vez del coágulo formado.

La regulación del sistema fibrinolítico está mediada por numerosas interacciones moleculares específicas entre sus componentes, además de por la síntesis y liberación (a partir de las células endoteliales) de los activadores e inhibidores de los activadores del plasminógeno [160]. De este modo, un fallo del sistema fibrinolítico puede desencadenar la aparición de trastornos hemorrágicos si está exacerbado o por contra puede predisponer a un riesgo trombótico si hay un defecto del mismo [161].

Componentes del sistema de la fibrinólisis

Las enzimas del sistema de la fibrinólisis son proteasas del tipo serina [162]. Entre ellas destaca:

- 1) Componentes principales del sistema fibrinolítico: plasminógeno y plasmina (forma activa del plasminógeno).
- 2) Componentes secundarios del sistema fibrinolítico:
 - Activadores del plasminógeno: Activador tisular del plasminógeno (t-PA) y Activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA).
 - Inhibidores de los activadores del plasminógeno: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno PAI-1 y PAI-2 (Inhibidores tipo 1 y 2 del activador del plasminógeno) y $\alpha 2$ -antiplasmina.

Activación del plasminógeno a plasmina

El plasminógeno es una GP de procedencia hepática de 92KDa de peso molecular y una concentración plasmática de 200 µg/mL. La acción proteolítica de los activadores del plasminógeno a plasmina tiene lugar a través de la rotura de la unión Arg560-Val561.

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) tiene un peso molecular de 70kDa y sus concentraciones plasmáticas son muy bajas (0,005µg/ml). Se produce por las células endoteliales y es el principal activador del plasminógeno a nivel intravascular. Su liberación se estimula por trombina, serotonina, bradicinina, citoquinas y EPI. Aunque en plasma el t-PA posee una constante de catalización (Kcat) baja para transformar el plasminógeno en plasmina, en presencia de fibrina aumenta notablemente la formación de plasmina ya que la Kcat aumenta de 200 a 400 veces al aumentar la afinidad entre el t-PA y su sustrato [163]. De este modo un aumento del t-PA produce tendencia a la hemorragia, mientras que su disminución conlleva una tendencia al tromboembolismo.

El u-PA es una GP de 54 kDa de peso molecular y concentración plasmática en torno a 0,001 µg/ml, producida y liberada por diferentes tipos celulares, células endoteliales y epiteliales (de forma mayoritaria las que recubren los túbulos renales), monocitos y células tumorales. Es el segundo activador fisiológico más importante del plasminógeno, interviniendo de forma significativa en la fibrinólisis extraplasmática y de forma minoritaria en la fibrinólisis plasmática. Para desarrollar una actividad proteolítica significativa en la superficie celular, el u-PA de cadena única (sc-uPA) debe ser transformado por la plasmina en una molécula de doble cadena (tc-uPA) de 54 kDa y 33 kDa de peso molecular respectivamente. La tc-uPA puede activar al plasminógeno tanto en ausencia como en presencia de fibrina, siendo la afinidad por la fibrina de u-PA muy inferior a la de t-PA.

En la regulación de la fibrinólisis es de gran importancia la presencia de la participación celular. La presencia de receptores glucoproteicos para u-PA en diferentes tipos celulares (a excepción de hematíes y plaquetas), además de los receptores celulares lipoproteicos para el plasminógeno, puso de manifiesto la importancia de la implicación de la superficie celular en la activación del plasminógeno a plasmina. A nivel extracelular sólo la forma de alto peso molecular (tc-uPA) se une a un receptor celular específico (uPAR), que es capaz de transformar el plasminógeno ligado a las células en plasmina [164].

Tanto el u-PA como el plasminógeno, al unirse a sus receptores celulares, están protegidos de sus respectivos inhibidores (PAI-1, PAI-2 y α 2-antiplasmina), permitiendo a la plasmina generada ser transportada al lugar donde vaya a ejercer su acción

proteolítica. Esta plasmina, por su característica de ser muy inespecífica respecto a su sustrato, tiene la capacidad de actuar sobre las proteínas de la matriz extracelular (adhesinas, integrinas) y de activar incluso a otras enzimas como la colagenasa. La plasmina generada se encarga de degradar proteínas de la membrana basal como son la trombospodina, laminina, fibronectina, elastina y vitronectina, aparte de la función que ejercen las metaloproteasas capaces de atacar a los componentes del sistema fibrinolítico [165].

Igualmente, los factores de la fase de contacto de la coagulación tienen actividad de activadores fibrinolíticos. La vitamina K, el factor XIIa y el factor XIa, aunque no llegan a superar un 15% de actividad plasmática, son activadores accesorios del plasminógeno.

Control de la fibrinólisis

La fibrinólisis es controlada por proteínas que pertenecen a la familia de los inhibidores de las serín-proteasas (serpinas) y evitan la actividad fibrinolítica fuera de la superficie de fibrina al formar un complejo enzima-inhibidor inactivo [162].

La α_2 -antiplasmina (de 72kDa de peso molecular y de concentración plasmática 70 μ g/mL) es una GP de síntesis hepática, aunque también se encuentra en el interior de las plaquetas. Funciona como una serín-proteasa inhibitoria y es la principal enzima que inactiva a la plasmina al formar con ésta un complejo 1:1 inactivo. Esta inhibición se lleva a cabo mediante dos reacciones consecutivas: la primera, rápida, da lugar a un complejo inactivo reversible que es seguida por una segunda reacción, más lenta, de la que resulta un complejo inactivo irreversible [166]. Aparte de la α_2 -antiplasmina, la α_2 -macroglobulina es otro importante inhibidor que actúa por atrapamiento de la plasmina [167].

El principal inhibidor de los activadores tipo t-PA y u-PA se denomina PAI-1 (peso molecular de 54 kDa), una serpina producida por los hepatocitos, MKs, plaquetas y células endoteliales que se acumula en los gránulos α de las plaquetas (hasta en un 90%). Aunque solo hay una pequeña cantidad de PAI-1 en plasma [168], el PAI-1 se concentra en el coágulo al ser liberado fundamentalmente por las plaquetas y las células endoteliales. La liberación de PAI-1 por las plaquetas activadas contribuye a la inhibición de la fibrinólisis y favorece la resistencia del trombo rico en plaquetas [169]. Igualmente es un reactante de fase aguda que aumenta en el proceso inflamatorio e infecciones y cuyos niveles aumentan en caso de riesgo trombótico o coronariopatía [170]. No obstante, el PAI-1 es muy lábil y pasa rápidamente a su forma inactiva, por lo que requiere ser estabilizado por la unión a la vitronectina. Otros inhibidores de menor

importancia son el PAI-2, que al producirse en la placenta, aumenta notablemente su concentración plasmática durante el embarazo inactivando en mayor medida al u-PA que al t-PA. El PAI-3 o inhibidor de la proteína C (PC) actúa de forma inespecífica sobre muchas serín proteasas (Proteína C activada, trombina, FXa, u-PA, t-PA, ect.).

1.3.5 REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN

La cascada de la coagulación posee unos mecanismos de regulación que la inhiben y hacen que su activación tenga lugar de forma controlada (Figura 17). En condiciones normales la superficie del endotelio aporta sustancias que dan fluidez a la sangre como son la ADP-asa, la prostaciclina y el óxido nítrico (factor de relajación endotelial) entre otros; la trombomodulina (TM), el cofactor II de la heparina, la PC y la antitrombina-III (AT-III) ancladas a la pared endotelial inhiben a la hemostasia secundaria; el t-PA liberado por el endotelio limita la formación de la malla de fibrina y el TFPI, proteína plasmática asociada a una lipoproteína, forma un complejo cuaternario con el FT, el FXa y el FVIIa que inhibe la vía extrínseca de la coagulación [171].

Al igual que el t-PA limita el crecimiento del trombo mediante la activación de la fibrinólisis, la trombina inhibiría la fibrinólisis mediante la activación del TAFI [172]. El TAFI activado libera residuos de Arg y Lis del extremo carboxilo terminal de la fibrina, produciendo una interferencia en el mecanismo de activación de la plasmina inhibiendo la lisis del coágulo.

Además, muchos de los factores de la coagulación activados (FIXa, FXa, FXIa y FXIIa) y la trombina son inhibidos por la AT-III asociada a los proteoglicanos anclados en la pared endotelial [173]. Se trata de una proteína que inhibe la actividad de las enzimas de la vía intrínseca y de la vía común de la coagulación. En presencia de la TM unida a las células endoteliales, la trombina activa a la PC, que a su vez, inactiva rápidamente el FVa y el FVIIIa, impidiendo la formación de nuevos complejos tenasa y protrombinasa. Como otras reacciones de la hemostasia, la acción de la proteína C activada (PCa) es acelerada por un cofactor, la proteína S [174].

Por tanto, el correcto funcionamiento del sistema hemostático depende del adecuado balance entre las reacciones procoagulantes por un lado, y las anticoagulantes y profibrinolíticas por otro. Cualquier anomalía que afecte a este sistema puede alterar dicho equilibrio y ocasionar estados de riesgo trombótico o hemorrágico.

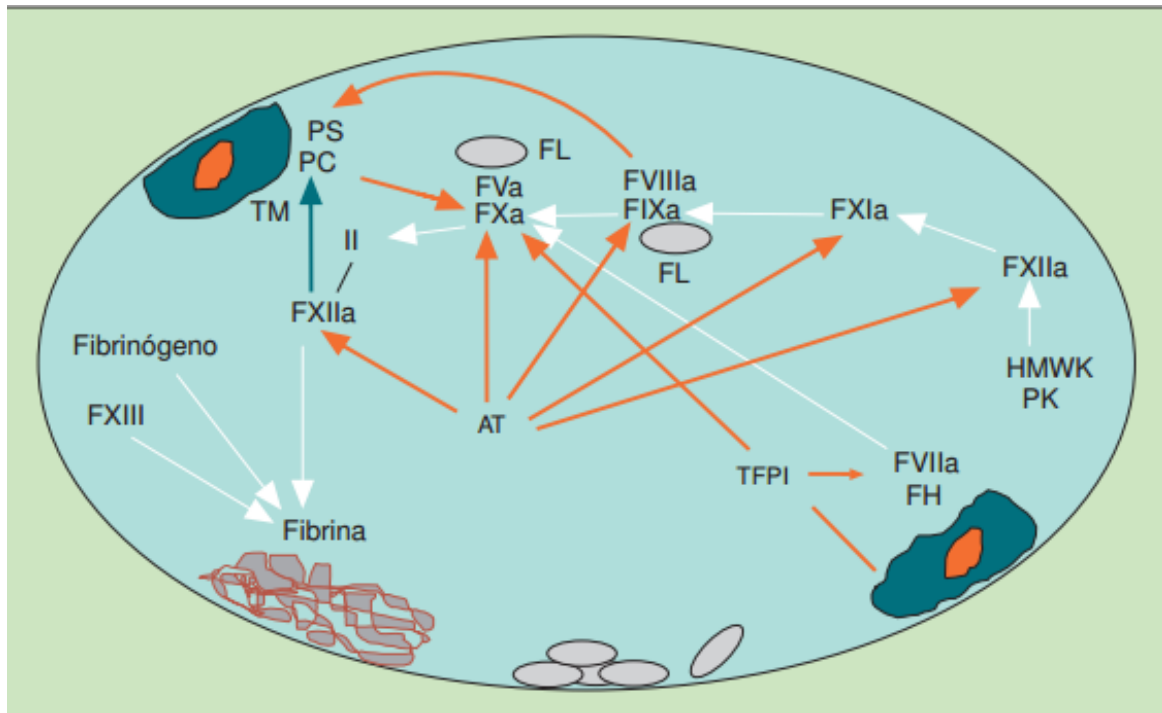


Figura 17. Esquema de los sistemas anticoagulantes naturales de la coagulación.

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular; AT: antitrombina; PC: proteína C; PS: proteína S; TM: trombomodulina.

(Figura extraída de "Coagulación y fibrinólisis plasmática. Estados de hipercoagulabilidad" G. Espinosa y J.C. Reverter)

1.4 TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN GLOBAL DE LA HEMOSTASIA

1.4.1 TROMBOELASTOMETRÍA ROTACIONAL (ROTEM®)

La tromboelastometría (TEM®) es un método viscoelastométrico útil para evaluar la hemostasia en sangre completa. Es una técnica capaz de medir de forma global y a lo largo del tiempo las interacciones entre los factores de coagulación, inhibidores y los componentes celulares durante las fases de coagulación y posterior lisis. Las condiciones reológicas de este método imitan el flujo lento de la sangre en las venas. La tromboelastometría se realiza en el sistema operativo ROTEM®, suponiendo una mejora respecto al método tradicional para estudiar de forma global la hemostasia de los pacientes.

Para esta técnica se coloca la muestra de sangre completa en una cubeta y se sumerge en ella un pistón cilíndrico. El pin rota por un resorte de derecha a izquierda. Mientras la sangre es líquida el movimiento es libre, no obstante, cuando la sangre comienza a coagular, el coágulo que está formándose dificulta cada vez más la rotación del pin de forma proporcional a la firmeza de éste (Figura 18). Esta cinética se detecta mecánicamente y se calcula mediante un software integrado a las curvas típicas (TEMograma) y parámetros numéricos del programa [175].

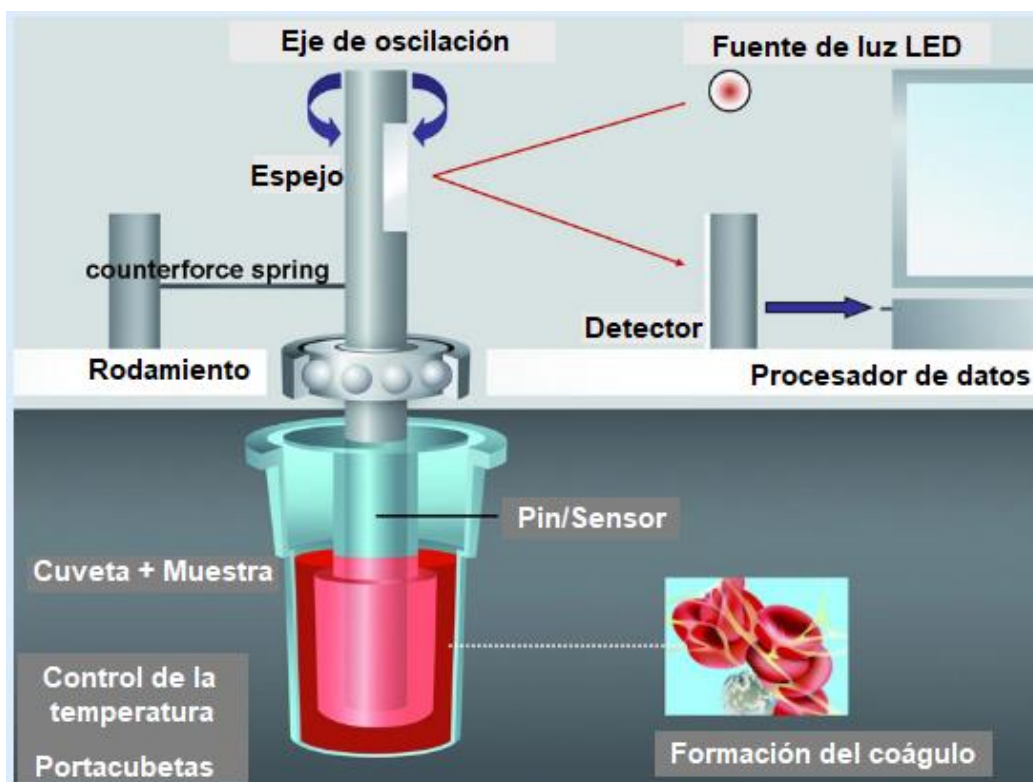


Figura 18. Mecanismo de la tromboelastometría rotacional (ROTEM®).

(Imagen extraída de <https://www.rotem.de/en/methodology/thromboelastometry/>)

Mediante esta técnica se pueden detectar alteraciones en el proceso de coagulación. Los resultados permiten disponer de forma rápida de un diagnóstico diferencial capaz de discriminar entre el sangrado postraumático y una alteración de la hemostasia, diagnosticar estados de hiperfibrinólisis, de ausencia de Fg o sustitución de plaquetas, así como monitorizar la acción de la heparina y protamina.

Los parámetros más empleados para caracterizar la cinética de formación del coágulo son (Figura 19):

- Tiempo de coagulación **CT** (segundos): tiempo que transcurre entre el comienzo del test y el inicio de la formación del coágulo (2 mm de Amplitud-eje "y"). El CT depende fundamentalmente de los niveles de los factores de coagulación y de sus inhibidores.
- Tiempo de formación del coágulo **CFT** (segundos): tiempo que transcurre desde el CT hasta lograr una amplitud de 20 mm.
- **Ángulo α** (grados): se calcula a partir de la tangente a la curva cuando la amplitud es de 2 mm.

- Fortaleza máxima del coágulo **MCF** (milímetros): es la amplitud máxima del coágulo.
- Lisis máxima **ML** (%): nos informa una vez alcanzada la fortaleza máxima del coágulo cómo se produce la reducción de su firmeza.

El ángulo α , junto con el CFT, son dos parámetros que describen la velocidad de formación del coágulo. Ambos parámetros, al igual que el MCF, son sensibles a posibles alteraciones en la polimerización de la fibrina, a la fibrinólisis, a la trombocitopenia o a una posible alteración de la función plaquetaria.

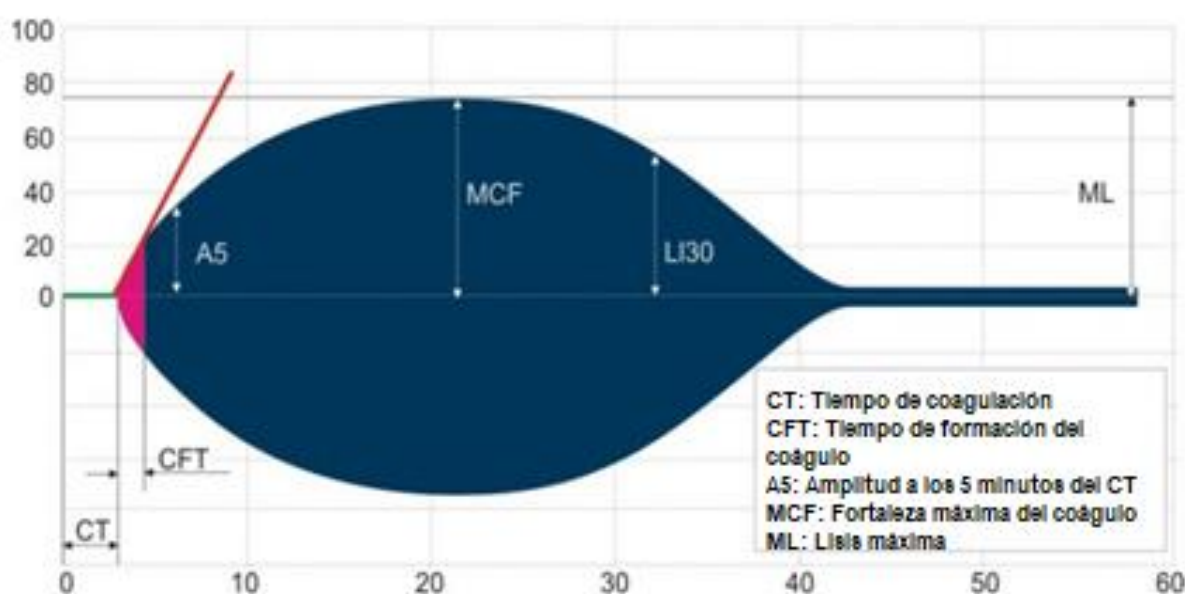


Figura 19. Gráfico y parámetros de la tromboelastometría rotacional (ROTEM®).
 (Imagen extraída de <https://www.rotem.de/en/methodology/rotem-delta-and-sigma-analysis/>)

Existen diferentes pruebas para evaluar la hemostasia mediante el ROTEM® [176]:

- 1) **NATEM**: evalúa el proceso de coagulación una vez producida la recalcificación del plasma sin agregar ningún activador.
- 2) **INTEM**: evalúa la vía intrínseca de la coagulación. Se emplea una solución con ácido elágico (polifenol que al pH al que se realiza el test se encuentra cargado negativamente, produciendo una activación moderada de la fase de contacto) y PLs (tromboplastina parcial de cerebro de conejo) como activador de la coagulación.

Este test es sensible a variaciones en los niveles de factores de coagulación, a alteraciones de la función y número de plaquetas, a la polimerización de la fibrina, a la concentración de Fg, así como a defectos en el mecanismo fibrinolítico. El test es sensible al empleo de anticoagulantes como la heparina (prolongación del CT cuando los valores de heparina en la muestra son $> 0,15$ U/ml), hirudina, argatroban y otros inhibidores de la trombina.

3) **EXTEM**: evalúa la vía extrínseca de la coagulación. En este test se emplea como solución activadora de la coagulación el FT recombinante.

Este test es sensible a deficiencias en los niveles de FVIII, FIX y FXI. Al igual que el test INTEM, el EXTEM permite evaluar la vía común de la cascada de la coagulación. Por ello, al igual que el INTEM, los valores de la amplitud y del CFT se afectan por alteraciones en los niveles de Fg y de la polimerización de la fibrina, por defectos de la función y disminución del número de plaquetas. Este test es un método útil para detectar un posible estado hiperfibrinolítico, pero el valor del CT no sirve para detectar niveles de heparina y derivados de ésta en la muestra.

4) **FIBTEM**: evalúa fundamentalmente la contribución de los niveles de Fg en la formación del coágulo. Emplea la citocalasina D con una función doble: activar la vía extrínseca de la coagulación e inhibir los elementos contráctiles de la plaqueta.

Además de las pruebas antes mencionadas, hay otras como el HEPTTEM para evaluar la posible contaminación de la muestra por heparina y el APTTEM para identificar estados de hiperfibrinólisis en la muestra del paciente.

Tabla 2. Valores de normalidad de los parámetros del ROTEM® según el test realizado.										
Nombre del test (reactivo)	CT (seg)	CFT (seg)	Ángulo α	A10 (mm)	A15 (mm)	A20 (mm)	A25 (mm)	MCF (mm)	CLI 30 (%)	ML (%)
INTEM	100-240	30-110	70-83	44-66	48-69	50-71	50-72	50-72	94-100	<15
HEPTEM	La activación es como un INTEM, al que se añade heparinasa para inhibir la presencia de heparina o anticoagulantes derivados de la heparina en la muestra.									
EXTEM	38-79	34-159	63-83	43-65	48-69	50-71	50-72	50-72	94-100	<15
APTEM	La activación es como un EXTEM, al que se añade aprotinina para inhibir la fibrinólisis. Sirve para identificar estados de hiperfibrinólisis.									
FIBTEM	-	-	-	7-23	-	8-24	-	9-25	-	-
	<ul style="list-style-type: none"> MCF <9 mm es un signo de bajo niveles de Fg o polimerización del coágulo alterado MCF >25 mm es un signo de elevados niveles de Fg (daría un EXTEM o INTEM normal, a pesar de estar ante un caso de trombocitopenia). 									
NATEM	300-1000	150-700	30-70	-	-	35-60	-	40-65	94-100	<15

1.4.2 TROMBINOGRAFÍA AUTOMÁTICA CALIBRADA (CAT®)

La trombinografía automática calibrada o CAT® (*Calibrated Automated Thrombogram*) es un método que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma cuando se produce la activación de la coagulación. En esta técnica se añade al plasma un sustrato fluorogénico que, al ser escindido por la trombina, libera un producto fluorescente proporcional a la cantidad de trombina que se haya generado. El objetivo es obtener información sobre cuál es la cinética de la generación de trombina. La trombina es responsable de la conversión del Fg (soluble) en fibrina (insoluble). La cascada de la coagulación tiene numerosos sistemas de retroalimentación y vías inhibitorias que influyen en la cantidad final de trombina generada. Esto hace que la cuantificación de la

concentración de trombina generada a lo largo del tiempo sea una buena herramienta para obtener una imagen completa de la misma [177, 178].

La activación de la coagulación se realiza con FT y una mezcla de PLs si la muestra es plasma pobre en plaquetas (PPP) y con FT si es plasma rico en plaquetas (PRP).

El experimento se ejecuta en una microplaca de 96 pocillos, en un fluorímetro comercial equipado con un filtro de excitación/emisión (390/640) a una temperatura de 37 °C asociado a un software específico. Durante el experimento, el trombograma aparece en el programa a tiempo real.

El CAT® es un método de gran aplicabilidad en el manejo clínico de los pacientes con cualquier trastorno trombotico genético o adquirido tal como la deficiencia de AT-III o el uso de anticonceptivos orales, es útil para monitorizar el tratamiento de pacientes con hemofilia, controlar el tratamiento empleado en pacientes con trastornos tromboticos y obtener un cuadro completo de la tendencia trombotica de los pacientes con alto riesgo de trombosis o sangrado.

Los parámetros que se obtienen del trombograma son calculados de forma automática por el programa Thrombinoscope BV® (Maastricht, Holanda) y son los siguientes (Figura 20) [179]:

- Tiempo de latencia "Lag time" (**TL**): tiempo requerido para la formación de 10 nM de trombina.
- Tiempo al pico "Time to peak" (**TAP**): tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de trombina.
- Altura del pico (**AP**): máxima concentración de trombina generada.
- Potencial endógeno de trombina (**ETP**): representa la capacidad máxima de generación de trombina de la muestra y es equivalente al área bajo la curva de la concentración de trombina vs al tiempo.
- Índice de velocidad (**IV**): permite calcular la velocidad con la que se genera la trombina durante el experimento y puede obtenerse a través de la siguiente fórmula:

$$IV = AP / (TAP - LT)$$

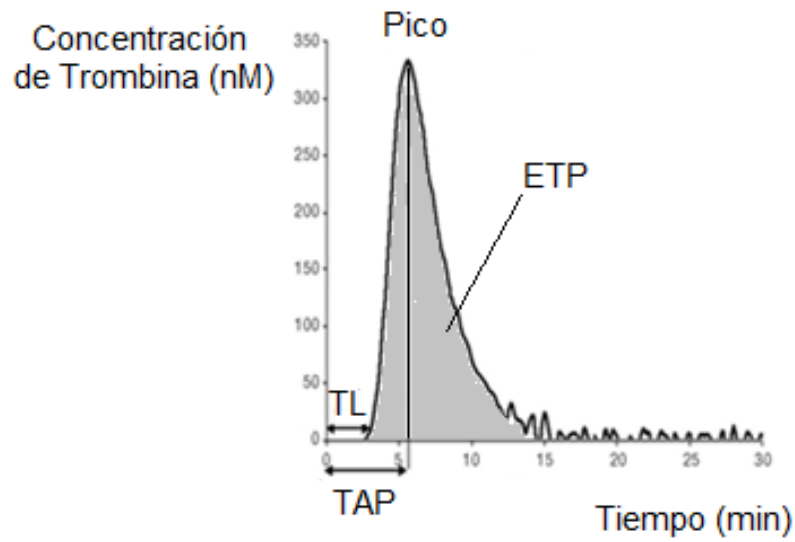


Figura 20. Trombinografía automática calibrada (CAT®). En la imagen se representa la cantidad de trombina (nM) que se genera con el tiempo (minutos) además de los distintos parámetros que se analizan: tiempo de latencia, tiempo al pico, altura del pico, potencial endógeno de trombina e índice de velocidad. *(Imagen modificada de Riley, 2012.)*

1.5 ASPECTOS GENERALES DE LA TROMBOCITOPENIA

1.5.1 INTRODUCCIÓN

Definición de trombocitopenia

La trombocitopenia se define como la disminución del número absoluto de plaquetas en la sangre periférica por debajo de $150 \times 10^9 / L$ (valor de referencia: 150 a $400 \times 10^9 / L$) [180], siendo clínicamente relevante cuando es inferior a $100 \times 10^9 / L$.

Manifestaciones clínicas de la trombocitopenia

Las manifestaciones clínicas suelen aparecer cuando el recuento de plaquetas está por debajo de $50 \times 10^9 / L$, pudiendo comprometer la vida del paciente cuando el recuento plaquetario está por debajo de $10 \times 10^9 / L$.

Cuando la trombocitopenia empieza a ser sintomática, ésta se manifiesta particularmente por petequias, equimosis y sangrado mucoso, las cuales usualmente se relacionan con la gravedad de la trombocitopenia.

De las diferentes manifestaciones de la trombocitopenia, las más frecuentes son:

1. **Petequia:** pequeña mancha en la piel (menos de 1 cm) debida a una efusión interna de sangre que no desaparece con la digitopresión.
2. **Equimosis o hematomas:** lesiones hemorrágicas subdérmicas que se presentan usualmente asociadas a traumas mínimos en individuos con trombocitopenia.
3. **Epistaxis:** episodios hemorrágicos por las fosas nasales.
4. **Menorragia:** menstruación inusualmente abundante o prolongada.
5. **Hematemesis y melenas:** hemorragia digestiva.
6. **Hemorragia urinaria o hematuria:** Ppresencia de sangre en orina.

1.5.2 CLASIFICACIÓN FISIOPATOLÓGICA DE LA TROMBOCITOPENIA

La clasificación fisiopatológica agrupa la etiología de la trombocitopenia de acuerdo a:

- **La disminución de la producción de las plaquetas o destrucción/consumo aumentado de plaquetas.**
- **El secuestro de las plaquetas:** se incluyen en esta forma de trombocitopenia tres situaciones clínicas bien definidas: el hiperesplenismo, la hipotermia y la que se puede presentar en pacientes politransfundidos.
- **La hemodilución:** se incluyen en esta forma de trombocitopenia dos situaciones clínicas bien definidas: la trombocitopenia gestacional y la trombocitopenia que se puede presentar en pacientes que han sido sometidos a reposición de volumen o transfusiones por sangrados masivos.

Trombocitopenia por disminución de la producción de las plaquetas o destrucción/consumo aumentado de plaquetas.

La trombocitopenia asociada a la reducción total o parcial en la producción de las plaquetas puede ser de carácter hereditario o adquirido y se relaciona con un daño en sus precursores, células madre, megacarioblastos, promegacariocitos y en los MKs.

- **Trombocitopenias hereditarias**

Son muy poco frecuentes, en muchas ocasiones infradiagnosticadas y difíciles de clasificar, en las que diferentes mutaciones genéticas condicionan una disminución de los MKs, una trombopoyesis ineficaz o alteraciones estructurales de las plaquetas.

En este grupo se encuentran algunas como la trombocitopenia megacariocítica congénita, trombocitopenia amegacariocítica con sinostosis radioulnar, trombocitopenia con ausencia de radio, los síndromes de Wiskot-Aldrich, de May-Hegglin; de Fechner, de Sebastian y Epstein y el síndrome de DiGeorge.

Desde el punto de vista práctico, las trombocitopenias hereditarias pueden ser clasificadas en dos grandes subgrupos:

- a) **Trombocitopenias hereditarias hipomegacariocíticas:** las más representativas de este grupo son la trombocitopenia con ausencia de radio, la trombocitopenia en la anemia de Fanconi y la trombocitopenia amegacariocítica congénita.

b) **Trombocitopenias hereditarias con trombopoyesis ineficaz:** se caracterizan por trombocitopenia en presencia de MKs normales o aumentados, con el resto de precursores y parámetros del hemograma normales [181].

- **Trombocitopenias adquiridas**

Las trombocitopenias adquiridas, mucho más frecuentes que las anteriores, se pueden clasificar según su origen, en centrales, periféricas o una combinación de ambas. Tiene lugar cuando la producción inadecuada e insuficiente de plaquetas se presenta en un momento concreto de la vida del individuo, ya sea por trastornos generalizados que afecten a la célula madre o en cualquiera de los pasos de maduración de los MKs, dando como resultado un balance negativo en la producción de plaquetas o un aumento de su destrucción. Así las trombocitopenias adquiridas se clasifican en:

a) **Las trombocitopenias centrales:** se deben a una afectación global de la megacariopoyesis o a una alteración específica de la línea megacariocítica (Tabla 3). Si la alteración afecta a la célula madre pluripotente, la trombocitopenia suele asociarse a otras citopenias; en cambio, si los precursores afectados ya están diferenciados hacia la línea megacariocítica, suele observarse una trombocitopenia aislada. Por otra parte, y según la intensidad de la afectación celular, es posible observar desde una aplasia total de la estirpe megacariocítica hasta una trombopoyesis ineficaz, en cuyo caso los precursores trombopoyéticos están presentes, pero no son capaces de producir plaquetas en condiciones adecuadas. Además, el estroma de la médula ósea puede estar ocupado por sustancias u otras células que comprometen la producción y diferenciación de las células hematopoyéticas.

Tabla 3. Causas de trombocitopenia de origen central.	
Por afectación global de la hematopoyesis	Supresión o hipoplasia <ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia aplásica 2. Hemopatías malignas 3. Otras lesiones medulares (citostáticos, radiaciones)
	Hematopoyesis ineficaz <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndromes mielodisplásicos 2. Hemoglobinuria paroxística nocturna 3. Déficit de factores de maduración
Por afectación megacariocítica aislada o predominante	<ul style="list-style-type: none"> • Púrpura trombocitopénica amegacariocítica adquirida
	<ul style="list-style-type: none"> • Trombocitopenia cíclica amegacariocítica
	<ul style="list-style-type: none"> • Otras: infección, alcoholismo...

- b) **Las trombocitopenias de origen periférico:** Comprenden todas aquellas trombocitopenias en las cuales las plaquetas son producidas adecuadamente en la médula ósea, pero presentan una vida media acortada en la circulación. Su etiopatogenia está relacionada con un incremento de las pérdidas, secuestro, hiperdestrucción o consumo, y se clasifican en inmunes o no inmunes (Tabla 4).

Tabla 4. Causas de trombocitopenia adquirida de origen periférico.

Origen inmune	Autoinmunes	• Trombocitopenia inmune primaria
		• Trombocitopenia inmune asociada (infección por VIH, VHC, enfermedades autoinmunes, síndromes linfoproliferativos crónicos)
		• Trombocitopenia inducida por fármacos (heparina, sulfonamidas, tiazidas, fenitoína, sales de oro, antagonistas de la GPIIb-IIIa)
	Aloinmunes	• Trombocitopenia neonatal aloinmune
		• Trombocitopenia postransfusional
		• Refractariedad a la transfusión de plaquetas
	Otras inmunes	• Pseudotrombocitopenia inmune
		• Trombocitopenia cíclica periférica
		• Síndrome antifosfolípido
		• Enfermedad injerto contra huésped
		• Enfermedad venoclusiva hepática
Origen no inmune	Hiperconsumo	• Coagulación intravascular diseminada
		• Microangiopatía trombótica
	Por destrucción	• Circuitos extracorpóreos, infecciones.
	Por pérdida la exterior	• Hemorragias, hemodiálisis
	Por distribución anormal	• Hiperesplenismo, hipotermia

1.5.3 TROMBOCITOPENIA INMUNE PRIMARIA (PTI)

Aspectos generales de la PTI

La trombocitopenia inmune primaria o PTI es un trastorno autoinmune caracterizado por una reducción de la supervivencia plaquetaria debido a su destrucción periférica, además de la supresión del desarrollo de MKs y plaquetas, lo cual predispone a sufrir hemorragias en los pacientes que la padecen [182]. La incidencia de la PTI es de aproximadamente 1,9-6,4 por cada 100.000 niños/año y 3,3-3,9 por cada 100.000 adultos/año.

La trombocitopenia autoinmune puede presentarse como un recuento de plaquetas bajo y aislado (recuento inferior a 100×10^9 plaquetas/L), sin relación con otras causas que lo justifiquen (PTI primaria) o como resultado de una afección subyacente (PTI secundaria) [183].

Esta enfermedad autoinmune, cuyo diagnóstico es fundamentalmente por exclusión, se caracteriza por una amplia variación en cuanto al número de plaquetas y su funcionalidad, además de presentar una sintomatología clínica de distinta gravedad en función de cada paciente. La PTI grave es aquella que cursa con hemorragias importantes que requieren una intervención terapéutica, es decir, aquellas que obligan a iniciar o a modificar el tratamiento.

Por todo lo anterior se trata de una enfermedad de características y curso clínico variable para cada paciente [182, 183]. Las fases en las que se clasifica la PTI en función del tiempo desde el diagnóstico quedan recogidas en la Tabla 5 [184].

Tabla 5. Fases de la PTI.	
Fases de la PTI	PTI de nuevo diagnóstico: dentro de los 3 meses desde el diagnóstico
	PTI persistente: entre 3-12 meses desde el diagnóstico (Con posibilidad de remisiones espontáneas).
	PTI crónica: > de 12 meses de duración

Etioopatogenia de la PTI

La trombocitopenia inmune primaria es una enfermedad inmune adquirida caracterizada por una trombocitopenia aislada debido a la producción de autoanticuerpos antiplaquetarios [185, 186], destrucción de plaquetas mediada por células T [187] y una función alterada de los MKs [188, 189].

El motivo que desencadena el proceso autoinmune es aún desconocido, no obstante, hay evidencias que relacionan el inicio de la PTI con un proceso infeccioso, inflamatorio u otras causas (PTI secundaria). Así se relaciona el desarrollo de la enfermedad con la presencia de agentes como el H.pylori, el VHC y el VHB, el VIH, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematosos sistémico o la artritis reumatoide, así como otras infecciones que iniciarían o perpetuarían la enfermedad mediante reactividad cruzada entre algún Ac contra el agente etiológico de la infección y la membrana de las plaquetas del individuo [190-193]. Por ello el tratamiento adecuado para la eliminación natural del proceso infeccioso subyacente contribuiría a un aumento del recuento plaquetario y a una disminución del título de autoanticuerpos [191]. Entre otras causas de PTI secundaria destaca la trombocitopenia inducida por fármacos (ácido valproico, heparina, ciertos antibióticos...), vacunaciones recientes o la trombocitopenia postrasplante de órgano sólido y de progenitores hematopoyéticos además de la trombocitopenia aloinmune y postransfusional.

Existen alteraciones genéticas que aumentan la susceptibilidad de padecer una enfermedad autoinmune como la PTI. A semejanza de otras enfermedades autoinmunes que tienen rasgos poligénicos, en la PTI se han descrito polimorfismos del TNF- α . Esta susceptibilidad genética ocasiona fallos en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y, como consecuencia, existen linfocitos autorreactivos en sangre periférica. Un desencadenante infeccioso o un daño tisular activará la respuesta inmune incluyendo a estos LT autorreactivos, que reaccionarán contra lo propio (las propias plaquetas del paciente) [194].

En la destrucción plaquetaria están involucrados los siguientes factores:

Producción de Acs, mayoritariamente del tipo IgG (aunque más raramente también Acs del tipo IgM o IgA), que van dirigidos contra fragmentos de las GPs de la membrana (normalmente la GPIIb-IIIa y en menor medida la GPIb-IX-V) de las propias plaquetas [195, 196] y MKs [197, 198]. Las plaquetas a las que se le unen los autoanticuerpos generados (plaquetas opsonizadas), serían posteriormente reconocidas por las células fagocíticas del sistema retículo endotelial (macrófagos y CDs fundamentalmente) que

tienen receptores de tipo Fc γ , desencadenando su fagocitosis y destrucción fundamentalmente en bazo, aunque también en hígado [185, 186, 199]. Además, los autoanticuerpos que se unen a la membrana de los MKs son responsables de inhibir su maduración e incluso promover su destrucción [200-202], reduciendo la capacidad de producir plaquetas en la médula ósea.

Está descrito que una producción plaquetaria disminuida se relaciona con niveles de TPO elevados. En la PTI existen unos niveles de TPO endógena disminuidos si se comparan con otras enfermedades que cursan con trombocitopenia, como es el caso de la aplasia medular o la trombocitopenia posquimioterapia. Dicha disminución de la TPO endógena en la PTI se puede explicar porque la masa de las plaquetas, una vez que la TPO se ha unido a su receptor en la superficie plaquetaria, sería eliminada por el sistema retículo endotelial produciéndose un aclaramiento tanto de la TPO como de las plaquetas [203, 204]. Todo ello conduciría a una disminución de la megacariopoyesis a nivel medular.

En la PTI se han detectado Acs dirigidos contra otras proteínas diferentes de las GPs de superficie plaquetaria, incluyendo proteínas citosólicas [205]. Esto sugiere que las plaquetas puedan ser sometidas a una degradación proteica mediada por las células presentadoras de antígeno (CPA) [206, 207]. De este modo, en ciertas ocasiones como en la presencia de procesos infecciosos o tras la administración de vacunas, las CPAs podrían exponer a las células T fragmentos de las GPs de la membrana plaquetaria que, junto con el HLA-DR, estimularía a los linfocitos T *helper*. Una vez activados, estos linfocitos sobreexpresarían el CD40L que se unirá al CD40 localizado en la membrana de los linfocitos B generando un conjunto de señales intracelulares que estimularían la secreción de Acs. Los efectos de la estimulación del sistema CD40/CD40L son la proliferación, la diferenciación y el cambio de clase de Ig del linfocito B. También participa en la estimulación de las CPAs y del linfocito T. Todo ello conduce a una activación, proliferación y diferenciación de los LB y, por tanto, a la síntesis de Acs antiplaquetas, que tras unirse a las mismas, serán destruidas por las células del sistema retículoendotelial del bazo o hígado (fagocitosis a nivel esplénico o hepático respectivamente).

Si bien se ha descrito que uno de los mecanismos implicados en la etiopatogenia de la PTI es la generación de Acs contra las plaquetas y los MKs del individuo, en un 30-40% de los pacientes no es posible detectar ningún tipo de Ac [208, 209]. Esto puede deberse a la falta de robustez de los test empleados para su detección o debido a que, aparte de los ya expuestos, podrían existir otros mecanismos adicionales implicados en la destrucción plaquetaria.

Se ha descrito que el tipo de epítipo diana de los autoanticuerpos podría tener un papel como biomarcador del grado de severidad que va a presentar la enfermedad en el individuo así como un valor predictivo en cómo va a ser la respuesta al tratamiento [210, 211]. De hecho se ha hipotetizado sobre cómo ciertos Acs específicos son capaces de inducir más aclaramiento y apoptosis plaquetaria [13, 212, 213] o podrían inhibir en mayor o menor medida la megacariopoyesis [201]. En este sentido la presencia de autoanticuerpos anti-GPIb plaquetarios inducen una mayor destrucción plaquetaria, debido a un incremento en la liberación de CD62P y PS en la superficie plaquetaria y a una agrupación de los receptores GPIb de las mismas [214]. En un modelo de ratones con PTI la presencia de este tipo de Acs hace que sean más resistentes al efecto terapéutico que pudiera tener el tratamiento con IGIV [210].

El BAFF (o factor estimulador de linfocitos B, Blys), junto a sus homólogos (APRIL, TRDL-1 y TALL-2) son homotrímeros pertenecientes a la superfamilia del TNF. Todos ellos son producidos por células del sistema inmune y están involucrados en la modulación de la diferenciación, supervivencia y maduración de las células tipo B. En 2007 se determinó por primera vez que los niveles séricos de BAFF estaban aumentados en pacientes con PTI activa y cómo el tratamiento con inmunosupresores como glucocorticoides, metotrexato y azatioprina, podían disminuir la expresión de BAFF a niveles normales [215]. En pacientes con PTI se han observado polimorfismos en la región promotora del gen del BAFF y un aumento en su actividad.

Se ha demostrado que el TLR7, que reconoce el ARNm viral, está implicado en la patogénesis de la PTI. La estimulación de TLR7 expresada en las CPAs es responsable de un aumento en la secreción de BAFF, que estimula las células B autorreactivas y aumentaría así la producción de Acs antiplaquetarios [216]. Además, está demostrado que la activación del TLR7 induce la secreción de IL-12 por las CPAs, lo que impulsa una respuesta Th1 por parte de las células T [217]. De este modo, durante las infecciones virales, las señales de peligro que produce el ARNm viral que comparte homología molecular con las GPs plaquetarias, son reconocidas por los TLR7 y, en un entorno de citoquinas apropiado, estimularán a las células B y T que pueden desencadenar una respuesta autoinmune en el individuo [218].

Otra de las causas que podría explicar la producción de autoanticuerpos contra las GPs de la membrana plaquetaria sería la presencia de TLRs en las plaquetas, convirtiéndolas en centinelas de infecciones, e interviniendo de forma directa en la respuesta inmune. Durante la infección, el patógeno podría unirse al TLR de la CPA y de la plaqueta. Este complejo al igual que cualquier otro Ag sería internalizado y destruido. Posteriormente,

partes de las GPs de la membrana plaquetaria destruida pueden ser expuestas a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y activar la producción de autoanticuerpos. Este mecanismo podría explicar la trombocitopenia asociada a infecciones graves, tanto en pacientes con PTI como en aquellos sin patologías concomitantes.

Distribución de las células inmunes en la PTI

A partir de diversos estudios del sistema inmune en animales, se cree que la homeostasis inmune se mantiene a través de un equilibrio entre la respuesta inmune tipo 1 (relacionado con $\text{IFN}\gamma$, IL-2, $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TNF}\beta$) y la tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) [219]. Durante un evento inflamatorio es característico evidenciar el dominio de un perfil de respuesta de tipo 1 o 2 y tras la resolución del mismo se produciría la supresión del fenotipo de respuesta inmune dominante y la restauración del equilibrio tipo 1 / tipo 2.

En la PTI, la relación entre las respuestas de tipo 1 y tipo 2 se encuentra desequilibrada (Figura 21). Así los pacientes adultos con PTI crónica primaria tienen elevados ratios Th1/Th2 (células *helper* o “cooperadoras” CD4+) y Tc1 / Tc2 (células citotóxicas CD8+) [220], poniendo de manifiesto la pérdida de tolerancia del sistema inmune a los Ags “propios”. También se observa que la relación CD4+/CD8+ total disminuye en la PTI y mejora con la remisión de la enfermedad [221].

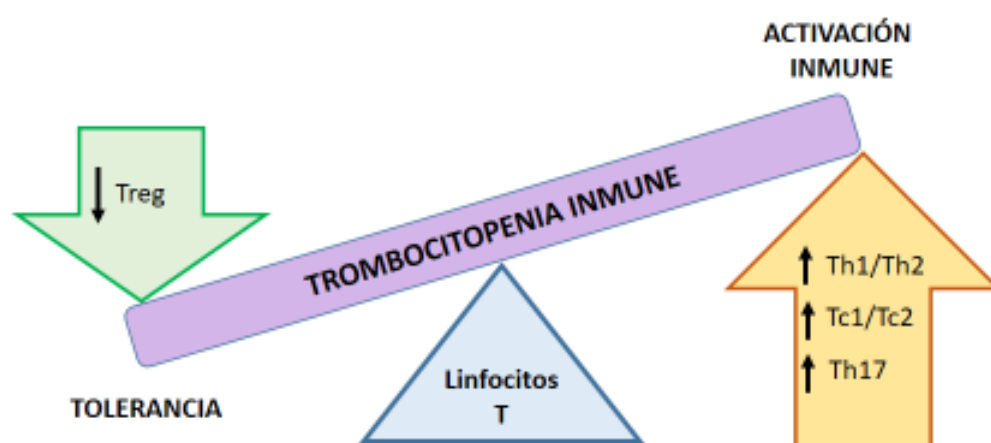


Figura 21. Respuesta inmune en la trombocitopenia inmune primaria.

Linfocitos T *helper*

Se ha demostrado que el desequilibrio de la relación Th1/Th2 se correlaciona con la gravedad de la enfermedad [222], lo que significa que cuanto mayor es el ratio Th1/Th2 en circulación y en el bazo, menor es el recuento de plaquetas. En la PTI existe un desbalance entre la respuesta de los linfocitos Th1/Th2, imponiéndose el efecto proinflamatorio (Th1) con liberación de citoquinas que activan la respuesta inmune. La polarización hacia Th1 se demostró por primera vez por el aumento de IFN- γ , TNF- β e IL-2 en el suero de pacientes con PTI [223] y se obtuvieron resultados similares al medir los niveles de ARN [222] o la expresión intracelular de IFN- γ en las células T [224]. También se ha descrito un aumento de la polarización hacia Th1 en las células T CD4+ esplénicas, que fue aún más pronunciada en pacientes refractarios a rituximab y se asoció con un aumento de las células CD8+ IFN- γ + (linfocitos Tc1) en estos pacientes [225].

De forma similar a las células T de tipo 1 y 2, éstas se definen por sus perfiles de secreción de citoquinas. Las células T que secretan IL-17 son proinflamatorias y de interés en la PTI, en parte debido a la evidencia existente que implica a la IL-17 en el desarrollo de autoinmunidad. Dentro del grupo de células T secretoras de IL-17 las células CD4+ Th17, al igual que las células CD8+ Tc17, están aumentadas en la PTI [221, 226]. Igualmente se ha identificado un subconjunto de células T CD4+ secretoras de la interleucina proinflamatoria IL-22, el Th22 (CD4+, IFN- γ -, IL-17-, IL-22+), que aumentan significativamente en los pacientes con PTI, correlacionándose con el aumento observado de las células Th1 y Th17 en dichos pacientes [227, 228]. Por lo tanto, además de la polarización hacia Th1 que es crucial para la estimulación de macrófagos, células *natural killer* (NK) y probablemente para promover la fagocitosis plaquetaria, otros subconjuntos de células T CD4+ parecen estar asociados con la etiopatogenia de la PTI.

Linfocitos T foliculares

Los linfocitos T *helper* foliculares (THF) juegan un papel crucial en la patogénesis de la PTI al favorecer la diferenciación de células B a células plasmáticas y la producción de Acs antiplaquetarios [229]. Igualmente, los THF participan en la formación de centros germinales y generan células de memoria, que contribuyen a la regulación de la respuesta inmune humoral que tiene lugar en procesos infecciosos, enfermedades autoinmunes o procesos tumorales. De hecho se ha observado un aumento significativo de los THF (definidos como células CD3+ CD4+, CXCR5+, ICOS+ y PD-1+) dentro del centro germinal de los folículos esplénicos de los pacientes con PTI que se

correlacionaron positivamente con el porcentaje de células B del centro germinal esplénico y de células plasmáticas. Los THF expresan CD40L y son los principales productores de IL-21 dentro del compartimiento de células T CD4⁺. Se ha demostrado *in vitro* que la estimulación con IL-21 y CD40 de las células B esplénicas de los pacientes con PTI se diferencian en células germinales del centro B y plasmablastos, y producen Acs anti-GPIIb-IIIa [229]. Del mismo modo, la IL-21 producida por algunas células T CD4⁺ y células T de tipo NK, es capaz de regular de forma positiva la producción de células Th17 y células B, estando elevada la expresión de IL-21 en células T de pacientes recién diagnosticados de PTI y no tratados [230].

Linfocitos T citotóxicos

La participación de las células T CD8⁺ en la patogénesis de la PTI está bien establecida. Los linfocitos T citotóxicos actúan sobre la destrucción periférica de las plaquetas y afectan a su producción en la médula ósea. Las células T CD8⁺ muestran un aumento en la expresión de proteínas implicadas en su capacidad citotóxica, como la perforina, la granzima A y la granzima B, lo que conduce a la apoptosis de las plaquetas cuando se cocultivan *in vitro* [187, 231, 232]. Por otro lado, cuando las células T CD8⁺ se cocultivan *in vitro* con los MKs, la producción de plaquetas se deteriora [233]. Por otro lado, *in vivo*, el reclutamiento de células T en la médula ósea también es mayor en pacientes con PTI [234]. Asociado a la activación de las células T CD8⁺, los niveles plasmáticos de granzima A y granzima B aumentan en algunos pacientes con PTI [235] y con respecto al compromiso de las células T CD8⁺, de forma similar a lo que se observa con las células T CD4⁺, la relación Tc1/Tc2 aumenta en la sangre y en el bazo de estos pacientes.

Células T reguladoras

Son muchas las publicaciones que han demostrado una disminución en el número y función de las células T reguladoras CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ (Linfocitos Tregs) en pacientes con PTI [236-239]. Entre las principales funciones de estas células destaca su papel inmunoregulador (generan tolerancia inmune), por inhibición directa de las células efectoras T CD4⁺, CD8⁺ [238], células B [240], CPAs y NK e inducir la secreción de IL-10, TGF- β e IL-35 [241, 242] y las propias citoquinas antiinflamatorias producidas por los propios linfocitos Treg.

En la PTI también se ha demostrado una reducción en el número de linfocitos Treg esplénicos [243] cuya funcionalidad está reducida [237], así como su presencia en la médula ósea de dichos pacientes [234]. No obstante, se ha descrito que esta deficiencia funcional de los linfocitos Treg se puede revertir en pacientes que responden a rituximab [239] o a los agonistas del receptor de trombopoyetina (AR-TPO) [244].

Por este motivo, el número de linfocitos Treg serviría como un biomarcador que nos informa del grado de actividad de la enfermedad [245, 246]. En los pacientes con PTI tanto las CPAs como los linfocitos Th y los LB eludirían la vigilancia de los linfocitos Treg, ya que estos últimos están disminuidos en estos pacientes, haciendo que los linfocitos Th induzcan la activación y proliferación de los linfocitos B y estos a su vez induzcan la producción de autoanticuerpos contra los Ags GPIIb-IIIa y/o GPIb-IX de la superficie plaquetaria.

Linfocitos B

Las células B también juegan un papel importante en la respuesta inmune, tienen capacidad presentadora de Ags a los LT y secretan IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α , que son capaces de activar a macrófagos y CDs. Esto explicaría por qué desórdenes en las células B permiten el desarrollo de enfermedades autoinmunes, ya sea tanto por la producción de autoanticuerpos como por la disregulación del sistema inmune que producen.

Se observó que las células B aumentaban en la pulpa roja del bazo de pacientes con PTI [247] y parecían tener tasas proliferativas más altas en estas áreas esplénicas [248]. Además, las células B reguladoras CD19⁺ CD24^{hi} CD38^{hi} (Breg), que promueven la tolerancia inmune periférica, también parece que están disminuidas en la PTI [249]. De este modo no lograrían reducir la activación de las células T CD4⁺, por lo que reclutarían menos células Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T [250] a través de la secreción de IL-10 por las células Breg [251].

Recientemente se ha demostrado que la subpoblación CD19⁺ CD24⁺ FOXP3⁺ Breg aumenta significativamente en el bazo de pacientes con PTI crónica refractaria (nueve pacientes) en comparación con el bazo de controles a los que se le extirpó debido a una lesión traumática no asociada a la PTI (ocho pacientes) [252]. Estos estudios sugieren que, al igual que los linfocitos Tregs, la deficiencia periférica de Bregs puede deberse al secuestro de estas células dentro de los compartimentos linfoides de los pacientes. Sobre estas bases se propone que los linfocitos Bregs, la secreción de IL-10 por éstos y sus

efectos moduladores sobre los linfocitos Tregs podrían tener un papel importante en la patogénesis de la PTI.

Células presentadoras de antígeno ó CPAs (Macrófagos, Monocitos y Células dendríticas)

Los macrófagos y las CDs, por ser las CPAs del sistema reticuloendotelial (sistema fagocítico mononuclear), funcionan para fagocitar los Ags circulantes, incluidas las plaquetas opsonizadas por los autoanticuerpos generados de forma anómala. La opsonización de los complejos autoanticuerpos-plaquetas por las CPAs facilita el procesamiento intracelular de las plaquetas y conduce a la presentación de los péptidos plaquetarios “extraños” por parte del CMH II de dichas CPAs. Este complejo es reconocido por el receptor de la célula T del linfocito T virgen (Th0), induciendo su diferenciación a LT CD4⁺ *helper* o linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Esto potenciaría la respuesta inmune antiplaquetaria. Una vez activados las CPAs y los linfocitos Th se produce la liberación de una serie de citoquinas proinflamatorias, produciendo la sobreexpresión del CD40L y activando a los linfocitos B, los cuales producen de nuevo Acs contra los Ags plaquetarios.

Igualmente, la activación de las CPAs tras su unión al Ag secreta IL-12, que contribuye a la diferenciación linfocitaria. A partir de este momento se produce la activación de la respuesta inmune hacia la formación de LT efectores y LT memoria. Las células T efectoras se dividen en tres tipos: los LT citotóxicos CD8⁺ que inducen apoptosis, los linfocitos LTh1 CD4⁺ que activan macrófagos y NK para ampliar la respuesta y los LTh2 CD4⁺ que activan a los LB. La respuesta efectora de los linfocitos Th1 y Th2 consiste en la secreción de factores de crecimiento, las ILs. La respuesta Th1 induce principalmente citoquinas ligadas a la inflamación como la IL-2, IL-6, IL-12, INF- γ y factor de necrosis tumoral β y la respuesta Th2 es responsable de la respuesta antiinflamatoria tras la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13.

Los autoanticuerpos unidos específicamente a los Ags de la superficie de las plaquetas y de los MKs no solo median su aclaramiento de la circulación a través de los receptores Fc γ Rs de las CPAs, sino que también pueden servir para fijar el complemento en las propias plaquetas, especialmente los Acs tipo IgM. El estudio de *Peerschke et al (2010)*, ha demostrado que plaquetas inmovilizadas *in vitro* e incubadas con el plasma de pacientes con PTI tienen mayor capacidad de fijar el complemento que si son incubadas con plasma de controles sanos [253]. Adicionalmente, se observó que las plaquetas de

pacientes con PTI fijan complemento y la capacidad de fijarlo se correlacionó de forma positiva con la presencia de Acs antiplaquetarios detectables. Por lo tanto, la inmunidad mediada por el complemento representa otro mecanismo por el cual los autoanticuerpos plaquetarios pueden conducir a la destrucción plaquetaria [253, 254].

Macrófagos

Los macrófagos desempeñan un doble papel en la patogénesis de la PTI. Como células efectoras los macrófagos contribuyen a la fagocitosis y destrucción de las plaquetas a través de sus receptores $Fc\gamma$ [255] y como células presentadoras de Ags, estimulan la respuesta inmune adaptativa.

Los macrófagos esplénicos desempeñan un papel clave en la estimulación de las células T en la PTI. Los análisis *ex vivo* revelan que macrófagos esplénicos estimulan espontáneamente células T específicas anti-GPIIb-IIIa, mientras que tanto las CDs esplénicas como las células B esplénicas necesitan haber estado en contacto con péptidos derivados de las GPIIb-IIIa para inducir la proliferación de células T [255].

Células dendríticas

Las CDs son una de las CPAs más eficientes, y se ha demostrado que tanto ellas como las CDs plasmocitoides, un subtipo de CDs especializadas en la producción de $INF-\alpha$ e $INF-\beta$, pueden encontrarse alteradas en pacientes con PTI [256]. Son varios los estudios que sugieren que la disfunción de las CDs, junto con una mayor propensión de las plaquetas a sufrir apoptosis, puede desempeñar un papel en la estimulación del sistema inmune en la PTI. Igualmente está descrito que las CDs plasmocitoides se encuentran disminuidas en pacientes con PTI primaria y PTI secundaria a *Helicobacter pylori*, observando que el recuento plaquetario se encuentra estrechamente relacionado con la cifra de estas células en la PTI, apoyando el papel fundamental de las CDs plasmocitoides en la etiopatogenia de esta patología [257]. Por tanto, la función de las CDs junto a otras CPAs, está alterada en pacientes con PTI contribuyendo a la activación linfocitaria.

Monocitos

Los monocitos son un componente clave tanto del sistema inmune innato como del adaptativo y son los precursores de las CDs. En pacientes con PTI los monocitos CD16⁺ totales, caracterizados por su capacidad de expresar citoquinas proinflamatorias y por su elevada potencia de estimular la presentación antigénica, están aumentados e inducen una polarización hacia una respuesta Th1 (especialmente los monocitos no clásicos o CD14⁺ CD16⁺⁺), y regulan negativamente la inducción de IL-17 y linfocitos Treg [258].

Se ha referido que los monocitos no clásicos están aumentados en pacientes con PTI activa y que mantienen una correlación negativa con los recuentos plaquetarios [258]. Por el contrario, sus niveles disminuían en los pacientes con PTI en remisión completa, lo que sugiere que los monocitos no clásicos podrían estar involucrados en la patogénesis de la PTI y ser un biomarcador para pacientes con PTI activa. Por otro lado el subgrupo de monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) permanece estable tanto en la fase activa de la PTI como en la fase de remisión, a pesar de su expansión en comparación con los controles. A su vez se detectó que los niveles plasmáticos de ciertas citoquinas como el TNF- α e IL-1 β estaban aumentadas en pacientes con PTI activa en comparación con los controles. Después de la remisión completa, la secreción de TNF- α se observó que disminuía rápidamente, lo que sugiere que los monocitos participan en la patogénesis de la PTI a través de su capacidad de secreción de diferentes tipos de citoquinas [259].

Diagnóstico de la PTI

El diagnóstico de PTI se establece por exclusión sistemática de otras causas de trombocitopenia. La aproximación inicial se basa en la revisión exhaustiva de la historia clínica del paciente (anamnesis), ya que aproximadamente el 20% de las trombocitopenias inmunes se asocian a otros procesos subyacentes. La exploración física, el hemograma y el examen de la extensión de sangre periférica son pruebas complementarias y necesarias para el diagnóstico de la PTI [260, 261].

Se deben evaluar las características de la hemorragia (si es cutánea o mucosa), su gravedad, extensión y tiempo de evolución [262]. Para evaluar la gravedad del sangrado es conveniente utilizar la escala de la OMS o el ITP-BAT [263, 264]. En 2013 el grupo de trabajo internacional ó IWG (International Working Group) propuso una escala específica para evaluar el sangrado en la PTI (ITP-BAT, bleeding assesment tool). Dicha escala clasifica los sangrados según su gravedad y localización anatómica, estableciendo tres grupos de sangrado: los localizados en la piel (petequias, equimosis o hematomas); los

localizados en mucosas visibles (bullas hemorrágicas, epistaxis, sangrado gingival, hemorragia subconjuntival); y los ubicados en órganos y mucosas internas [264].

Igualmente deben identificarse posibles condiciones concomitantes que pudieran aumentar el riesgo hemorrágico de estos pacientes. Todo ello permitirá una mejor valoración de la situación clínica específica de cada individuo para lograr un tratamiento más seguro y efectivo.

Pruebas complementarias en el diagnóstico de la PTI

Debido a que las causas de la trombocitopenia son diversas va a ser necesario hacer pruebas complementarias para asegurar un diagnóstico certero de PTI y descartar otras posibles patologías o enfermedades subyacentes que cursen con trombocitopenia.

El examen de la extensión de sangre periférica es esencial para confirmar la trombocitopenia, excluir la pseudotrombocitopenia por EDTA y otras trombocitopenias asociadas a SMD, leucemia, anemia megaloblástica, microangiopatía o algunas otras de origen congénito.

En la PTI las plaquetas pueden tener un volumen plaquetario medio (VPM) ligeramente aumentado, pero la detección de plaquetas excesivamente grandes, agranulares o muy pequeñas debe alertar sobre la existencia de otras enfermedades.

Junto a otros estudios complementarios sistemáticos se debe solicitar la dosificación de Igs preferiblemente antes de su indicación terapéutica, para descartar una deficiencia de IgA o un estado de inmunodeficiencia. El estudio de infecciones víricas, como las hepatitis B y C y la infección por el VIH, es obligatorio.

El estudio de médula ósea no se recomienda como prueba de rutina, pero debe considerarse en pacientes mayores de 60 años, en los que muestren refractariedad o mala respuesta al tratamiento de primera línea, cuando existan rasgos atípicos en sangre periférica y antes de indicar la esplenectomía. En estos casos se debe realizar un aspirado/biopsia de médula ósea con estudio citogenético. Tanto el documento de consenso internacional (IWG) como su adaptación en los diferentes países y el documento de consenso para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI avalado por la SEHH (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia) [265] recomiendan las siguientes pruebas diagnósticas (Tabla 6) [261, 266]:

Tabla 6. Pruebas complementarias recomendadas para el diagnóstico.	
Estudios sistemáticos básicos	<ul style="list-style-type: none"> • Hemograma con reticulocitos. • Extensión de sangre periférica. • Estudios de coagulación. • Bioquímica básica de sangre y orina. • Dosificación de inmunoglobulinas.
Estudios de autoinmunidad	<ul style="list-style-type: none"> • Test de Coombs directo. • Anticuerpos antinucleares.
Estudios microbiológicos	<ul style="list-style-type: none"> • VIH • VHC y VHB
Estudios de médula ósea	Pacientes: <ul style="list-style-type: none"> • > de 60 años. • Refractarios a tratamientos de primera línea. • Con rasgos atípicos en sangre periférica. • Previo a la prescripción de un tratamiento de segunda línea.
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpos antifosfolípidos. • Anticuerpos antitiroideos y pruebas de función tiroidea. • H. pylori (prueba del aliento). • Otras serologías.

Aunque no existe ningún test diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para la PTI, la respuesta al tratamiento nos puede confirmar la orientación diagnóstica. Por ello es fundamental disponer de una historia clínica completa del paciente, con una exploración física compatible (síntomatología hemorrágica, localización de la misma, hepatoesplenomegalia que oriente a un diagnóstico distinto al de PTI...). Conocer la existencia de antecedentes familiares de trombocitopenia es importante para realizar las pruebas diagnósticas pertinentes y descartar posibles trombocitopatías que cursen con trombocitopenia como la enfermedad de Bernard-Soulier.

Manifestaciones clínicas

Los pacientes con PTI se caracterizan por tener una alteración en la hemostasia primaria, desencadenando sangrado mucocutáneo, petequias, equimosis y bullas hemorrágicas en mucosas (mayoritariamente en la cavidad bucal). El signo más característico de la trombocitopenia es el sangrado, que suele ser mucocutáneo. Cuando predominan las petequias y equimosis le suelen llamar púrpura seca y cuando es mayoritario el sangrado mucoso (epistaxis, sangrado gingival, menometrorragias...) la llaman púrpura húmeda. No obstante, la lesión cutánea hemorrágica mayoritaria en el paciente con PTI es la petequia. También son frecuentes las llamadas equimosis, que son hematomas superficiales de más de un centímetro y que no se diseminan más allá de la piel [267].

En la mayoría de los casos la clínica de la PTI es leve, siendo las hemorragias intracraneales y gastrointestinales las más graves, pero también las menos frecuentes. En aquellos pacientes que presentan síntomas éstos se suelen correlacionar con la cifra de plaquetas, aunque intervienen otros factores como la edad del paciente, su estilo de vida, la presencia de uremia, entre otros. De este modo recuentos plaquetarios entre 150 hasta $30 \times 10^9/L$ no suelen generar sangrado de manera espontánea, pero sí tras traumatismos. Mientras que pacientes con recuentos plaquetarios menores de $30 \times 10^9/L$ presentarán por lo general hemorragias espontáneas. En los pacientes que presentan una cifra de plaquetas por debajo de $10 \times 10^9/L$ la posibilidad de complicaciones hemorrágicas graves se incrementa significativamente.

La astenia es otro síntoma que presentan los pacientes con PTI, la cual empeora notablemente su calidad de vida [268, 269]. Aunque se desconoce el mecanismo por el que se produce, se piensa que pueda estar relacionado con la posible anemia y el consiguiente déficit de hierro en los pacientes con clínica hemorrágica. También se ha descrito que el estado proinflamatorio de la patología autoinmune pueda tener un papel en la astenia que padecen algunos de los pacientes con PTI [270].

La mortalidad debida a causas hemorrágicas es infrecuente en estos pacientes, aunque los pacientes mayores de 60 años y aquellos con hemorragias previas tienen un mayor riesgo de sufrir sangrados [271]. Varios trabajos ponen de manifiesto que la escasa clínica hemorrágica que sufren los pacientes con PTI puede deberse a que existen diferentes mecanismos procoagulantes compensatorios que hacen que su clínica hemorrágica sea menos frecuente y menos grave que en pacientes con una trombocitopenia de origen central y de similar recuento de plaquetas. Entre los factores que se relacionan con la disminución del riesgo hemorrágico en pacientes con PTI destaca la presencia de plaquetas menos disfuncionales, una mayor generación de

trombina debido a una mayor concentración de MPs de características procoagulantes, un aumento de la resistencia a la PC así como un aumento en los niveles plasmáticos de E-selectina y PAI-1 [272, 273]. En este sentido varios trabajos refieren la existencia de un aumento del riesgo de trombosis en los pacientes con PTI, incluso sugiriendo la existencia de un posible estado de trombofilia en alguno de los pacientes con PTI [274]. Es importante distinguir entre los pacientes con alto riesgo de sufrir sangrados que necesitan tratamiento y aquellos que no tienen clínica hemorrágica pese al bajo recuento plaquetario y en los que el tratamiento podría aumentar el riesgo de sufrir eventos trombóticos. Entre las escalas para evaluar el sangrado en los pacientes con PTI destaca el de la OMS (Tabla 7) y el propuesto por el IWG [263, 264].

Tabla 7. Escala de sangrado de la OMS.	
Grado	Tipo de Sangrado
0	Ninguno
1	Petequias, equimosis de menos de 2,5 cm, sangre oculta en heces u orina, leves pérdidas vaginales
2	Hemorragia evidente que no requiera transfusión de concentrado de hematíes, aparte de las necesidades transfusionales rutinarias: epistaxis, hematuria, hematemesis, melenas
3	Hemorragia que requiera la transfusión de 1 o más concentrados de hematíes
4	Hemorragia con amenaza vital, definida como una hemorragia masiva que causa compromiso hemodinámico o hemorragia dentro de un órgano vital (por ejemplo: hemorragia intracraneal, pericárdica, pulmonar)

1.5.4 TRATAMIENTO DE LA PTI

Consideraciones generales

El objetivo principal del tratamiento de la PTI es revertir y evitar la hemorragia manteniendo la cifra de plaquetas en un nivel seguro (superior a $20-30 \times 10^9/L$). La mortalidad asociada a la PTI es de 0,016-0,038 por paciente y año a riesgo (0,5-5%) [275], y la morbimortalidad en estos pacientes está asociada tanto a la hemorragia como a los efectos secundarios del tratamiento [276]. El riesgo de hemorragia grave suele asociarse a recuentos de plaquetas inferiores a $10 \times 10^9/L$ y es mayor en pacientes de edad avanzada. Por último, hay que tener en cuenta que hasta un 9% de los pacientes adultos pueden tener una remisión espontánea (por lo general en los primeros 3-12 meses tras el diagnóstico) y entre un 3 y un 15% desarrolla una enfermedad autoinmune sistémica en los siguientes años tras el diagnóstico de PTI [261]. Por tanto, los objetivos principales del tratamiento de la PTI son revertir y evitar la hemorragia manteniendo la cifra de plaquetas en un nivel seguro.

El comienzo del tratamiento en PTI debe ser individualizado para cada paciente debido a las siguientes razones:

1. Gran parte de los pacientes son asintomáticos a pesar del bajo recuento plaquetario.
2. Los pacientes con PTI tienen un aumento del riesgo de trombosis y algunos de los tratamientos disponibles pueden incrementar este riesgo, especialmente en pacientes esplenectomizados.
3. La morbimortalidad se debe tanto al sangrado como a los posibles efectos secundarios del tratamiento empleado.
4. El riesgo de hemorragia grave es bajo, aunque aumenta con la edad.

La mayoría de las guías, entre ellas el documento de consenso de la SEHH, utilizan como criterio para recomendar el inicio del tratamiento una combinación entre el número de plaquetas y el fenotipo hemorrágico del paciente, edad y presencia de comorbilidades (Tabla 8).

Tabla 8. Criterio de inicio de tratamiento en función del recuento plaquetario.	
Cifra de plaquetas ($\times 10^9/L$)	Inicio del tratamiento
<20-30	En general, está indicado iniciar el tratamiento independientemente de la presencia de hemorragia.
>20-30 y <50	Solo se recomienda el inicio del tratamiento en los siguientes casos: diátesis hemorrágica, necesidad de cirugía o de técnicas invasivas o estilo de vida que predisponga a traumatismos.
>50	En general no está indicado el tratamiento. Sólo se recomendaría en caso de cirugía del SNC u ocular, disfunción plaquetaria, necesidad de anticoagulantes a dosis plenas.

En todos los casos, el tratamiento deberá ser siempre personalizado y nunca exclusivamente con el objetivo de normalizar el número de plaquetas. Entre las consideraciones a tener en cuenta y que condiciona el tratamiento a elegir destaca:

1. Toxicidad y dosis del tratamiento de elección: elegir el tratamiento menos tóxico y a la dosis más baja posible.
2. Presencia de manifestaciones hemorrágicas, circunstancias especiales como intervenciones quirúrgicas y, en determinadas ocasiones, la cifra de plaquetas.
3. Características de cada paciente (trabajo, edad, estilo de vida, aficiones, enfermedades asociadas y comorbilidades, etc.).
4. Fase de la enfermedad: en la PTI de reciente diagnóstico (<3 meses) y PTI persistente (3-12 meses) aún es posible la remisión espontánea hasta en un 9% de los pacientes adultos. Por el contrario, en la PTI crónica (a partir de un año desde el diagnóstico) la remisión espontánea es mucho más infrecuente.
5. Criterios de respuesta al tratamiento (Tabla 9) [184].

Tabla 9. Nomenclatura para definir los criterios de respuesta en la PTI.	
Remisión Completa (RC)	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento plaquetario $>100 \times 10^9/L$ y ausencia de hemorragia
Respuesta (R)	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento plaquetario $\geq 30 \times 10^9/L$, incremento en más de dos veces la cifra basal y ausencia de hemorragia
No respuesta (NR)	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento plaquetario $< 30 \times 10^9/L$ o incremento inferior a dos veces a cifra basal o presencia de síntomas hemorrágicos.
Pérdida de respuesta	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento plaquetario $< 100 \times 10^9/L$ o hemorragia (si RC previa) o recuento $< 30 \times 10^9/L$ o menos de dos veces del valor basal o hemorragia (si R previa).
Corticodependencia	<ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de dosis repetidas o mantenidas de glucocorticoides para mantener un recuento plaquetario $\geq 30 \times 10^9/L$ y/o evitar la hemorragia
PTI refractaria	<ul style="list-style-type: none"> • No alcanzar respuesta o pérdida de respuesta tras esplenectomía, con necesidad de tratamiento continuado para disminuir el riesgo de hemorragia

Tipos de tratamiento para la PTI

El objetivo del tratamiento en la PTI no es exclusivamente normalizar la cifra de plaquetas, sino alcanzar una cifra segura para prevenir o parar la clínica hemorrágica (superior a $20-30 \times 10^9/L$). El arsenal terapéutico para el manejo de la PTI es múltiple y se puede dividir en dos grupos (Figura 22) [207]:

1. Tratamiento dirigido a disminuir la destrucción periférica de las plaquetas, como los esteroides, las inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) o la esplenectomía. Hay centros que siguen usando el rituximab (anti-CD20) y otros inmunosupresores, a pesar de no tener indicación en ficha técnica para la PTI.
2. Tratamiento que aumenta la producción de plaquetas, como son los agonistas del receptor de trombopoyetina (AR-TPO). En este grupo se encuentran el romiplostim y eltrombopag.

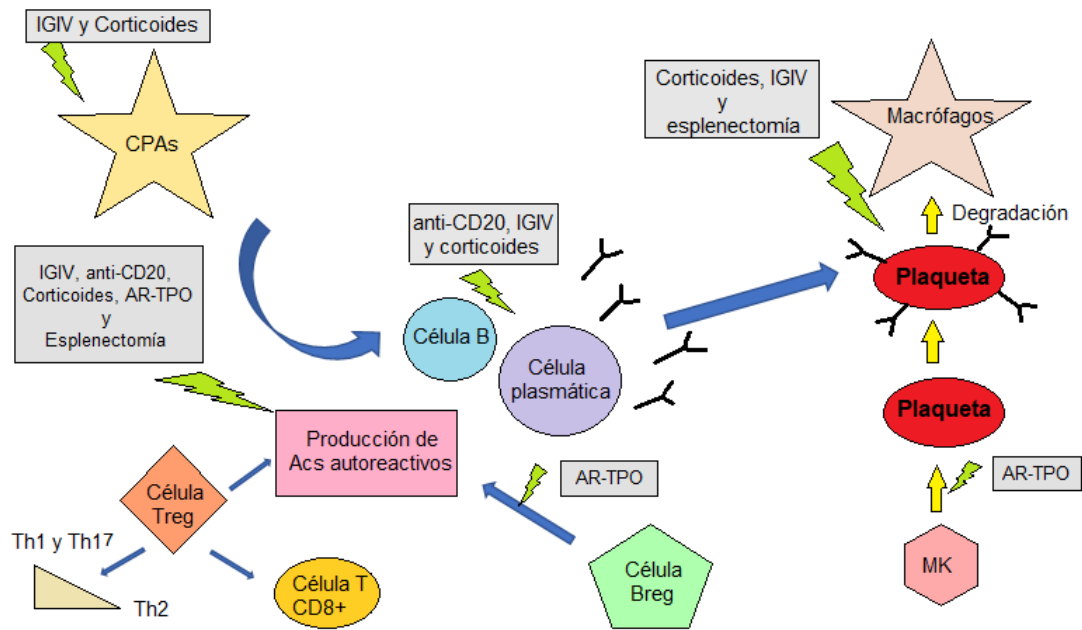


Figura 22. Mecanismos terapéuticos para el tratamiento de la PTI. Dentro de los distintos tratamientos se encuentran los de primera línea (corticoides e IGIV), los de segunda línea (esplenectomía y/o AR-TPO) y los de tercera línea (anti-CD20).

(Imagen modificada de Zufferey et al, 2017.)

Tratamiento de primera línea

En el tratamiento inicial de la PTI se recomienda el empleo de glucocorticoides o IGIV en función de las características del paciente y la presencia o no de clínica hemorrágica (Tabla 10).

Tabla 10. Fármacos utilizados en primera línea de tratamiento.

Tipo de tratamiento	Mecanismo de acción	Fármaco	Dosis	Tasa de respuesta
Corticoides	Antiinflamatorio (incrementan la integridad vascular, dificultan la opsonización e inhiben el sistema mononuclear fagocítico). Se logra una inmunosupresión celular y humoral.	Prednisona (PRD)*	1 mg/kg/día durante 2 a 4 semanas**	Respuestas entre un 40-70% a los 5-10 días, y de ellas se mantienen un 30%.
		Dexametasona (DXM)	40 mg/día x 4 días, cada 2-4 semanas x 1-6 ciclos	Respuestas entre el 80-90%, a los 5-7 días, el 40-70% de ellas mantenidas en el tiempo.
IGIV***	Bloqueo del sistema retículo endotelial, por inhibición de los receptores para la Fc de las IG, inhibición de Fc γ RIIB, neutralización de autoanticuerpos circulantes, anticuerpos anti-idiotipo y efectos inmunomoduladores sobre los linfocitos T y B.	1g/kg/días x 2 días		Respuestas iniciales de un 80% entre 2-4 días. Respuesta transitoria volviendo a cifras de plaquetas previas entre 2 y 4 semanas.

*Es el corticoide más usado. **Dosis más altas no obtienen mejores resultados. Se recomiendan mantener dosis completa durante 2 semanas e iniciar una bajada progresiva de dosis durante 4-6 semanas y, en caso de no obtener respuesta, buscar una terapia alternativa. *** Actualmente la mayoría de las IGIV comercializadas no tienen IgA, Ig altamente alergénica y que producía eventos graves en pacientes con déficit de IgA. El resto de efectos secundarios como la cefalea se pueden controlar con premedicación y disminuyendo el ritmo de infusión en caso de aparecer.

(Tabla extraída del libro de Hemostasia y Trombosis en la práctica clínica de Inmaculada Soto Ortega y María Teresa Álvarez Román. Capítulo 4. Trombocitopenia: Trombocitopenia inmune. pag 107).

a) CORTICOIDES

Los glucocorticoides son el tratamiento estándar de primera línea usado en los pacientes con PTI. Su mecanismo de acción consiste en la modulación de una gran cantidad de genes, estimulando cambios fisiológicos al unirse a los receptores citosólicos. A través de la disminución de BAFF y modulando las CDs, regulan la activación de las células B. En algunos estudios al combinarlos con rapamicina o rituximab se ha observado que tienen un efecto modulador sobre las células T al aumentar el número de linfocitos Tregs circulantes, restaurando el ratio Th1/Th2 y normalizando la subpoblación Th17, aumentando la IL-10 y el TGF- β [277, 278].

Los esquemas de tratamiento de la PTI con glucocorticoides más utilizados en la práctica clínica se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Dosis de corticoides empleadas en la práctica clínica.	
Fármaco	Posología
Prednisona	1 mg/Kg/día
Prednisona	0,5-2 mg/Kg
Dexametasona	40 mg/día durante 4 días (cada 2 semanas, durante 3 ciclos)
Dexametasona	40 mg/día durante 4 días (cada 2-4 semanas, durante 1-6 ciclos)

A corto plazo, los efectos secundarios más frecuentes son: retención hídrica (lo que contribuye a un incremento del peso corporal), hipertensión, aumento de la glucemia, alteraciones psicológicas, cambios de humor, insomnio, molestias digestivas e incluso ulcus gástrico. A largo plazo pueden producir dificultad en la cicatrización de heridas, fragilidad de la piel, alteraciones endocrinas, debilidad y atrofia muscular, osteoporosis, desarrollo de cataratas, incremento de la presión intraocular e insuficiencia adrenal (en caso de que el tratamiento no se discontinúe de manera correcta) [279].

- **Prednisona**

La dosis inicial más habitual es 1 mg/kg/día. Es importante limitar en el tiempo el tratamiento con corticoides con el fin de reducir los efectos secundarios; en este sentido, es recomendable mantener la dosis completa de 2 a 4 semanas e iniciar una bajada progresiva de dosis durante 4-6 semanas y, en caso de no obtener respuesta, buscar una terapia alternativa [279]. Algunos pacientes llegan a requerir una prolongación del tratamiento con prednisona para mantener un recuento plaquetario adecuado. En estos casos sería recomendable valorar una segunda línea de tratamiento, ya que dosis de prednisona superiores a 5-10 mg/día de forma mantenida se asocian a un alto riesgo de efectos secundarios graves.

- **Dexametasona**

Se plantea como una alternativa a la prednisona. La dosis recomendada es de 40 mg/día, durante 4 días, cada 2 semanas y un total de 6 ciclos [280]. La principal ventaja frente a la prednisona es que se trata de un tratamiento mejor definido en el tiempo y más recortado, lo que permite una mayor adherencia al tratamiento, reduce la dosis total de corticoides y, en la mayoría de los casos, genera una respuesta más rápida y de mayor duración [280, 281].

Un reciente estudio multicéntrico, prospectivo y aleatorizado de *Wey .Y et al (2016)*, en el cual se comparaba la eficacia entre prednisona (97 pacientes recibieron prednisona 1mg/kg/d durante 4 semanas y posterior pauta descendiente) y dexametasona a altas dosis (95 pacientes recibieron dexametasona 40mg/día, durante 4 días, uno o dos ciclos si no respondían al primero) mostró que inicialmente la tasa global de respuesta fue superior con dexametasona a altas dosis que con la prednisona (82,1 vs 67,4), con una tasa de respuesta completa de 50,5 vs 26,8% respectivamente [282]. También se concluyó que el tiempo para obtener una respuesta al tratamiento fue menor y mejor tolerado en aquellos pacientes que recibieron dexametasona a altas dosis comparado con los que recibieron prednisona. No obstante, la tasa de respuesta sostenida fue

semejante en ambos grupos (41,2% para los que recibieron prednisona y 40% para los que fueron tratados con dexametasona a altas dosis).

b) INMUNOGLOBULINAS INTRAVENOSAS (IGIV)

Es un tratamiento de primera línea. En general, se usan en combinación con los corticoides en primera línea terapéutica en pacientes con hemorragia activa grave (OMS > 2) en los que se requiere una respuesta rápida. En caso de que el tratamiento con glucocorticoides esté contraindicado (psicosis o diabetes no controlada con el tratamiento adecuado), se pueden usar las IGIV en primera línea y valorar posteriormente alguna de las opciones de tratamiento de segunda línea. La dosis recomendada es de 1 g/kg/día durante 2 días (se pueden establecer otras pautas repartiendo los 2 g/kg entre 2 y 4 días, para mejorar la tolerancia). Se ha descrito una tasa de respuesta de hasta el 90%, pero habitualmente de carácter transitorio limitada a 2-6 semanas.

Las principales indicaciones de la IGIV son: 1) el tratamiento de situaciones urgentes, 2) la preparación para la esplenectomía en pacientes resistentes o intolerantes a corticoides, 3) demorar la esplenectomía en niños o en adultos con mal estado clínico, 4) el tratamiento durante el embarazo y, 5) en caso de contraindicaciones absolutas a esteroides. Las indicaciones de la Ig anti-D son idénticas, pero no es aplicable a pacientes Rh negativos ni esplenectomizados. Además, no está disponible en el mercado europeo por razones de seguridad desde 2009.

Las IGIV se obtienen por fraccionamiento industrial del plasma de donantes sanos mediante el método de Cohn modificado. La fracción proteica II de Cohn contiene un 95% de IgG y cantidades menores de IgA, IgM, IgD, IgE y otras proteínas y sustancias vasoactivas que tienden a formar agregados moleculares. Para evitar las reacciones adversas producidas como consecuencia de estas sustancias se introduce una etapa de purificación que puede ser por métodos enzimáticos, métodos químicos o por otros no desnaturizantes. Al proceso de fraccionamiento se le añade un paso de inactivación viral para minimizar la carga viral en el proceso de fabricación.

Se han descrito efectos adversos tras la administración de IGIV en el 5% de los pacientes, que pueden aparecer durante o después de la infusión. Las más frecuentes son las reacciones alérgicas asociadas a escalofríos, cefalea, dolor de espalda, fiebre, así como náuseas y vómitos. También pueden producirse reacciones cutáneas, dolores articulares e hipotensión. Descensos bruscos de la tensión arterial y, en casos aislados, shock anafiláctico son complicaciones menos frecuentes que pueden presentarse incluso en pacientes que no han presentado hipersensibilidad a anteriores administraciones.

Otros efectos adversos reversibles y poco frecuentes son la meningitis aséptica, la anemia hemolítica, e incremento en los niveles de creatinina sérica y/o fallo renal agudo. Muy raramente se han observado complicaciones tromboembólicas.

Los mecanismos de acción de las IGIV son complejos, que se basa fundamentalmente en la modulación de la expresión de los receptores Fc, según el tipo celular y el estado de receptividad de la célula. Entre estos destacan:

- **Efectos dependientes de Fc**

- Bloqueo o saturación funcional de los receptores Fc: los receptores Fc contribuyen a la eliminación por parte de las células fagocíticas de las moléculas o las células que son opsonizadas por la IgG, mediante fagocitosis o citotoxicidad mediada por células dependientes de Acs. En dichas situaciones, la IGIV satura los receptores Fc de monocitos y macrófagos, bloqueando la fagocitosis de las plaquetas opsonizadas por autoanticuerpos, conduciendo a un rápido incremento del número de plaquetas
- Inhibición del sistema del complemento: se debe a la capacidad de unión de la Ig (región Fc) a los fragmentos C3b y C4b del complemento. Esta función previene el depósito de fragmentos activos de C3 y C4 en los tejidos, lo que conllevaría el bloqueo de la formación de la enzima convertasa C5 (C4b2a3b), previniendo de este modo el daño tisular mediado por el complemento [283-285]. Esta propiedad no se restringe a una subclase de Ig ya que las 4 subclases de IgG y los diferentes alotipos de IgG presentan una fuerte capacidad de inhibición de C3b/C4b.
- Expansión de los linfocitos T CD4⁺ reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺): los linfocitos T CD4⁺ desempeñan un papel central en el inicio y mantenimiento de la respuesta inmunológica específica de Ag. Aunque no se conocen bien los mecanismos, diversos estudios han demostrado la capacidad de las IGIV para suprimir la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógenos e inhibir la producción de citoquinas. Hay estudios que sugieren que tanto la IGIV como los fragmentos de F(ab')₂ podrían inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados con Acs anti-CD3 y anti-CD28 [286]. Igualmente las IGIV pueden modular el sistema inmunológico mediante la expansión en número y potenciación adicional de la función supresora que ejercen los linfocitos Treg FOXP3⁺ [287], células clave en la homeostasis del sistema inmunológico y en

la inducción de tolerancia inmune. *De Groot et al (2008)*, observaron que las moléculas de IgG contienen epítomos específicos en la región Fc que son capaces de activar dichos linfocitos Treg CD4⁺CD25^h FOXP3⁺ [288].

- Disminución del número de monocitos proinflamatorios no clásicos CD14⁺CD16⁺⁺: los monocitos no clásicos representan aproximadamente el 10% del total de monocitos en sangre y se caracterizan por la capacidad de producir citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-12 [289]. *Zhao et al (2009)*, describieron que este tipo de monocitos proinflamatorios presentan una elevada expresión de genes proapoptóticos [290], haciéndolos susceptibles a la apoptosis que parece que inducen las IGIV a través de su unión y entrecruzamiento con los CD32b, convirtiéndolos en la principal diana de la actividad antiinflamatoria de las IGIV.

- **Efectos dependientes de Fab**

- Bloqueo de los fragmentos C3a y C5a: las IGIV tienen la capacidad de bloquear diferentes componentes del sistema del complemento, como las anafilotoxinas C3a y C5a, a través de su unión con la región Fab15.
- Neutralización de autoanticuerpos y/o inhibición de su producción: las IGIV, especialmente aquellas procedentes de la mezcla de plasma de un gran número de donantes, presentan Acs antiidiotipo capaces de interactuar específicamente con los determinantes idiotípicos de los autoanticuerpos, capacidad que permite a la IGIV regular los clones de linfocitos B autorreactivos in vivo [291, 292].
- Activación o bloqueo funcional del receptor de muerte Fas (CD95): se ha demostrado que la IGIV puede afectar la muerte celular dependiente de caspasas al unirse al receptor Fas (CD95) de la membrana celular de linfocitos y monocitos [293, 294].

- **Efectos dependientes de Fc y Fab**

- Supresión de la producción de citoquinas y modulación de moléculas de adhesión: hay estudios que han demostrado que las IGIV disminuyen la síntesis de citoquinas de naturaleza proinflamatoria por células mononucleares de sangre periférica estimuladas con superantígenos bacterianos o

lipopolisacáridos, como son la IL-1, TNF- α , TNF- β e INF- γ . También inducen un incremento de la producción del antagonista del receptor de la IL-1, molécula de naturaleza antiinflamatoria que contrarresta los efectos de la IL-1 [295]. En los efectos antiinflamatorios de las IGIV están involucradas ambas porciones de su estructura (Fc y F(ab')₂), que se unen a moléculas presentes en la membrana de las células del sistema inmune que son esenciales en el control de la autorreactividad y de la tolerancia a lo propio [292].

- Modulación de las propiedades de las CDs: los fragmentos Fc y F(ab')₂ de la IGIV son capaces de modular la supresión de las CDs regulando la secreción de citoquinas esenciales para la maduración de las CDs y para la respuesta mediada por linfocitos T. La incubación de las CDs con IGIV disminuye la expresión del CMH clase II, hecho que afecta la capacidad de la CD madura de producir la citoquina IL-12 [296]. Por el contrario, la secreción de IL-10 aumentada inhibe la proliferación y activación de los linfocitos T autorreactivos y de los alorreactivos.
- Regulación de los linfocitos B: varios estudios han demostrado que las IGIV inhiben de forma dosis dependiente el receptor Fc γ RIIb de linfocito B mediante unos mecanismos dependientes e independientes de la presentación antigénica, destacando el papel antiinflamatorio de las IGIV a este nivel [297-300].

Los mecanismos de acción de la IGIV divididos según las regiones de la molécula IgG que participan se recogen en la Figura 23 y en la Tabla 12.

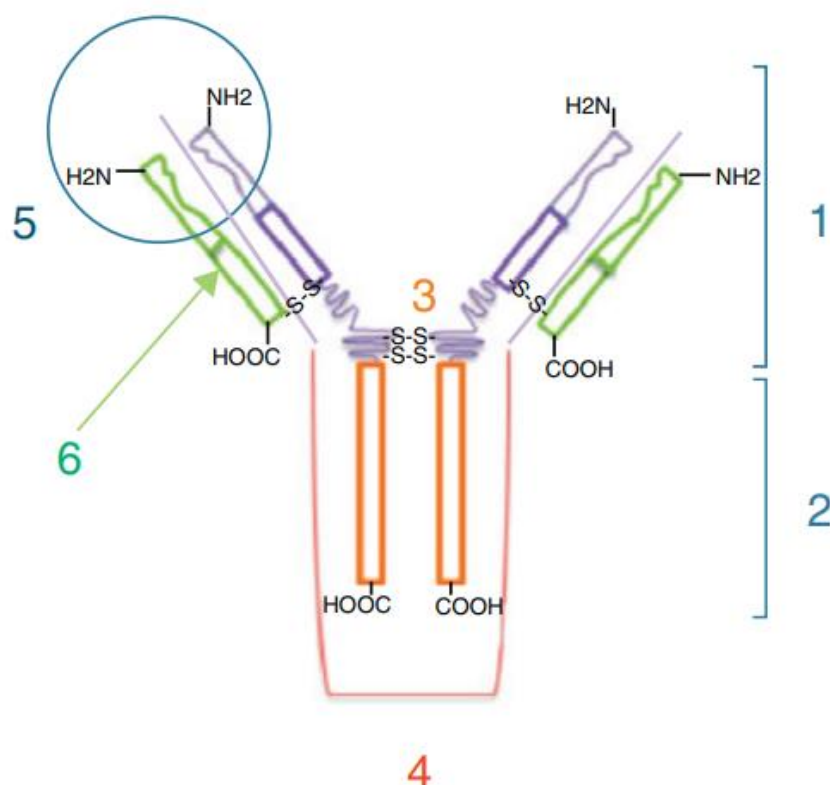


Figura 23. Estructura esquemática de una molécula de IgG. 1: Región variable Fab. 2: Región constante Fc. 3: Región bisagra. 4: Cadena pesada. 5: Sitio de unión al Ag. 6: Cadena ligera. S-S son los puentes disulfuros.

Tabla 12. Mecanismos de acción de las IGIV divididos según la participación de las regiones de la molécula IgG.

<p>Dependientes de la porción Fab:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueo de los fragmentos C3a y C5a. • Neutralización de autoanticuerpos y/o inhibición de su producción. • Activación o bloqueo funcional del receptor de muerte fas (CD95). • Unión a lectinas. 	<p>Dependientes de la porción Fc y Fab:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Supresión de citoquinas, producción de antagonistas de citoquinas y modulación de moléculas de adhesión. • Modulación de las propiedades de las CDs. • Regulación de los linfocitos B.
<p>Dependientes de la porción Fc:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bloqueo o saturación funcional de los receptores Fc. • Inhibición del sistema del complemento. • Expansión de las células T CD4+ reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). • Disminución del número de monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ proinflamatorios. 	<p>Otras:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incremento de la sensibilidad a corticoides. • Efecto neuroprotector.

Tratamiento de segunda línea

En los pacientes que recaen o no responden adecuadamente a la primera línea de tratamiento se deberá iniciar una segunda línea de tratamiento de acuerdo con las características de cada paciente, con el objetivo de alcanzar una cifra de plaquetas segura de forma mantenida. De esta forma se trata de evitar la aparición de efectos hemorrágicos con la menor toxicidad posible. La Tabla 13 muestra las estrategias usadas en segunda línea.

Tabla 13. Estrategias terapéuticas utilizadas en segunda línea.

Tipo de tratamiento	Mecanismo de acción	Dosis	Tasa de respuesta
Agonistas del receptor de la trombopoyetina (AR-TPO)	Romiplostim	<p>La dosis de inicio es de 1 µg/kg, incrementando la dosis semanalmente a 1 µg/kg hasta conseguir alcanzar un recuento plaquetario de al menos 50x10⁹/L</p> <p>Si la cifra de plaquetas de 2 semanas consecutivas es >150x10⁹/L, debe bajarse la dosis en 1 µg/kg. Si fuera > 250x10⁹/L, el tratamiento debe suspenderse temporalmente para volver a iniciarlo (con una dosis inferior en 1 µg/ kg) cuando la cifra de plaquetas sea <150x10⁹/L. No sobrepasar los 10 µg/kg.</p>	80-90%
	Eltrombopag	<p>Dosis de inicio de 50 mg/día vía oral y de 25 mg/día en pacientes de origen asiático o con insuficiencia hepática grave. Se puede subir la dosis hasta un máximo de 75 mg/día con el fin de alcanzar un recuento plaquetario >50 x10⁹/L.</p> <p>Es importante considerar que 2h antes y 4h después de su administración se deben evitar antiácidos, calcio o suplementos vitamínicos que pudieran interferir en su correcta absorción.</p>	80-90%

<p>Esplenectomía laparoscópica o irradiación esplénica (esta última es una alternativa válida en pacientes no candidatos a esplenectomía)</p>	<p>Consiste en la extirpación del órgano responsable de producir las Ig así como el principal sitio destructor de las plaquetas opsonizadas.</p>	<p>Esplenectomía:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Respuesta en un 80% de los pacientes. El 60% la mantiene a los 5 años. El tiempo para obtener una respuesta es de 1 a 56 días. • La mayoría de las recaídas se producen en los 2 primeros años, aunque no hay evidencia de estabilización definitiva de la cifra de plaquetas con el tiempo. <p>Irradiación esplénica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Respuesta en un 50% de los pacientes, con un 30% de recaídas en los primeros 3 años, susceptibles de obtener una nueva respuesta con una reembolización. • Generalmente previa a una esplenectomía urgente en pacientes con una cifra de plaquetas muy bajas y sin respuesta al tratamiento.
--	--	---

Tabla adaptada del libro de Hemostasia y Trombosis en la práctica clínica de Inmaculada Soto Ortega y M^a Teresa Álvarez Román (Capítulo 4. Trombocitopenia: Trombocitopenia inmune. pag 109).

a) ESPLENECTOMÍA

La esplenectomía se ha considerado durante mucho tiempo como el tratamiento con mayor tasa de remisiones completas duraderas, llegando a ser visto como el tratamiento de elección de 2ª línea. Sin embargo, es una intervención de alto riesgo con efectos secundarios indeseables (infecciones y trombosis). La aparición en el mercado de los agentes trombopoyéticos ha provocado que su realización se haya reducido de forma notable [301].

El bazo es el principal lugar de activación de células T y B autorreactivas contra las plaquetas y de su destrucción. La esplenectomía restaura los recuentos plaquetarios o se alcanzan respuestas parciales hasta en un 60-70% de los pacientes a los 5 años. La ausencia de respuesta o las recaídas pueden estar en relación con el aclaramiento de los macrófagos unidos a plaquetas por los receptores FcγRIIa y FcγRI por el sistema reticuloendotelial localizado en otros tejidos, por ejemplo, el hígado.

Aunque la morbilidad y mortalidad asociadas a este procedimiento han disminuido de forma notable desde que se emplea el procedimiento laparoscópico, la extirpación quirúrgica del bazo no está exenta de complicaciones a corto y a largo plazo [302]. Entre las principales ventajas e inconvenientes destacan:

Ventajas:

- Su realización no reduce la respuesta a otras alternativas terapéuticas (Rituximab o AR-TPO).
- Baja morbilidad del procedimiento.
- Bajo coste, comparado con otros tratamientos de 2ª línea.
- Alta seguridad, si se utiliza en pacientes que prevean quedarse embarazadas.

Inconvenientes:

- La falta de parámetros para predecir la respuesta antes de recurrir a la esplenectomía. Hay estudios que ponen de manifiesto la importancia de los estudios de cinética plaquetaria a este nivel, ya que se ha demostrado que aquellos pacientes que tenían un patrón de secuestro esplénico alcanzaban una tasa de respuesta de hasta un 87% (manteniendo esta respuesta tras 3,8 años de seguimiento) tras la esplenectomía, frente a un 35% en aquellos con secuestro hepático o patrón mixto.

- Aumento de las complicaciones infecciosas (La septicemia ocurre con un riesgo relativo de 1,4 durante el primer año post-cirugía), donde el neumococo juega un papel importante a este nivel (la tasa de mortalidad en estos casos llega a un 50%).
- Aumento de las complicaciones trombóticas [303-305]. Entre ellas cabe destacar la mayor incidencia de trombosis venosa profunda en pacientes con PTI esplenectomizados que en pacientes sin esplenectomizar, mayor riesgo de complicaciones vasculares posquirúrgicas en pacientes esplenectomizados (más frecuentes en el primer año postcirugía) y el riesgo de sufrir trombosis de la vena porta como complicación en la cirugía tanto abierta como laparoscópica.

Se deben tener en cuenta diversos aspectos cuando se valora la realización de una esplenectomía en pacientes con PTI:

1. **Pacientes en los que está indicada:** La esplenectomía está indicada como tratamiento de segunda línea en sujetos con PTI persistente o crónica grave en los que no esté contraindicado realizar esta intervención quirúrgica. No se recomienda su realización antes de que transcurran 6 meses desde el diagnóstico, dada la posibilidad de mejorías o remisiones espontáneas en una pequeña proporción de pacientes [306]. Parece que los sujetos más jóvenes, sin comorbilidades y en el que se demuestre que la destrucción plaquetaria es fundamentalmente esplénica mediante alguna técnica diagnóstica de cinética plaquetaria son los candidatos idóneos para la esplenectomía. Aproximadamente el 80% de los pacientes responden a la esplenectomía, manteniendo una cifra de plaquetas normal a los cinco años en más del 60% de los casos [307] y la mayoría de las recaídas se producen en los dos primeros años tras la esplenectomía. No se han definido contraindicaciones específicas de la esplenectomía para pacientes con PTI, aunque la tasa de morbilidad de la esplenectomía aumenta en relación con factores como la obesidad, la edad avanzada y la pluripatología crónica [276]. La mortalidad relacionada con la esplenectomía varía entre el 1 y el 0,2% en función del método empleado. Entre las complicaciones postoperatorias destacan las hemorragias, los abscesos subfrénicos, la trombosis venosa profunda y las complicaciones respiratorias (neumonías y atelectasias) [276, 308]. Por todo ello el documento de consenso del grupo internacional, la guía española y la guía alemana, contraindican la esplenectomía en pacientes mayores de 65 años con comorbilidad asociada, obesidad, procedimientos quirúrgicos previos o infecciones graves.

2. **Vacunas a administrar al paciente esplenectomizado:** El Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad recomienda administrar una serie de vacunas generales como son la DTP (difteria, tétanos, pertussis), VPI (polio inactivada), Hib (*Haemophilus influenzae* tipo b), VPH (virus del papiloma humano), TV (triple vírica), VHB (virus de la hepatitis B), vacunas meningocócicas MenC/MenACWY según edad y vacunas específicas como la de la gripe anual, neumococo VPN-C-13 o VPN-P-23 según edad, VHA y VHB (virus de la hepatitis A y B), Men B y varicela. Si la esplenectomía es programada habría que vacunar 2 semanas antes de la intervención quirúrgica y si es urgente y no programada se debe vacunar 2 semanas después. Además se recomienda revacunar a los 5 años frente al neumococo, el meningococo y *Haemophilus influenzae* [309].
3. **Pruebas a realizar previas a la cirugía:** se recomienda realizar un estudio de médula ósea y alguna prueba de imagen como la tomografía axial computarizada para descartar la presencia de bazo accesorios.

b) AGONISTAS DEL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA (AR-TPO)

Para los pacientes en los que la esplenectomía esté contraindicada o que no la acepten, los nuevos agentes trombopoyéticos son la alternativa que ofrece una mayor eficacia y menor toxicidad (únicos con grado de recomendación A según las guías internacionales). Ambos agentes son considerados eficaces y bien tolerados para el tratamiento de segunda línea de la PTI.

Los agonistas del receptor de TPO son fármacos con un mecanismo de acción totalmente diferente al de los fármacos que se han utilizado clásicamente en el tratamiento de la PTI, ya que no modifican directamente la respuesta inmune sino que aumentan la producción plaquetaria, estimulando el receptor de la TPO. Se dispone de dos agentes trombopoyéticos, el romiplostim y el eltrombopag, que están aprobados para el tratamiento de adultos con PTI crónica refractaria a otros tratamientos como corticoides o IGIV, no siendo necesario que esté contraindicada la esplenectomía. Ambos actúan activando los receptores de la TPO en los MKs y plaquetas e incrementan la producción plaquetaria a través de la vía JAK2 y STAT5 quinasa [310]. El romiplostim actúa a través del dominio extracelular (CRH2) del receptor de TPO, al igual que la TPO endógena, haciendo que las señales de transducción que se generan sean similares a las inducidas de forma fisiológica por la TPO. Por el contrario, eltrombopag lo hace en el dominio transmembrana distinto al sitio de unión de la TPO endógena.

- **Romiplostim**

Se administra por vía subcutánea una vez por semana, iniciando el tratamiento con una dosis de 1 µg/kg e incrementándola en 1 µg/kg/semana hasta alcanzar un recuento plaquetar de $> 50 \times 10^9/L$. Si la cifra de plaquetas es $> 250 \times 10^9/L$, debe suspenderse el tratamiento temporalmente, para volver a iniciarlo con una dosis reducida en 1 µg/kg cuando la cifra de plaquetas sea $< 150 \times 10^9/L$.

Es una proteína recombinante compuesta por dos dominios: un dominio peptídico (formado a su vez por 4 péptidos) capaz de unirse al receptor de TPO endógena (a nivel del dominio extracelular CRH2) y un dominio transportador formado por dos fragmentos Fc de IgG1 que prolongan la vida media de la molécula en la circulación sanguínea. El dominio peptídico, al no tener homología con la TPO endógena, evitaría la aparición de posibles Acs que podrían neutralizarla.

Además, el romiplostim restaura el balance de receptores $Fc\gamma$ incrementando la expresión del inhibidor $Fc\gamma RIIb$ en monocitos y disminuyendo los receptores $Fc\gamma RIIa$ y $Fc\gamma R1$ reduciendo la fagocitosis. También parece incrementar los linfocitos Treg, probablemente debido a un incremento de TGF- β y los linfocitos Breg, lo que sugiere que este agonista tiene también un efecto modulador del sistema inmune [207, 311].

El estudio de extensión que incluyó a 292 pacientes diagnosticados de PTI tratados con romiplostim concluyó que los acontecimientos adversos más frecuentes descritos en los pacientes tratados con este agente eran leves, predominando las cefaleas (38%) y la astenia (32%). Asimismo, la incidencia de complicaciones tromboembólicas con romiplostim en los estudios clínicos fue del 6% (en el grupo placebo, 3,6%), por lo que se debe tener precaución cuando se indican en pacientes con factores de riesgo trombóticos conocidos (edad avanzada, inmovilizaciones, obesidad, tratamientos hormonales, anticoagulante lúpico, antecedentes de trombosis, etc). En algunos pacientes se ha observado un aumento de la reticulina en la médula ósea, que es reversible tras la retirada del fármaco [312-314]. El mismo estudio mostró que hasta el 82% de los pacientes lograron una respuesta mantenida en el tiempo durante al menos 3 semanas consecutivas desde la administración de la medicación [315]. Posteriormente se observó que es posible retirar o disminuir la medicación concomitante para el tratamiento de la PTI en hasta un 87% de los pacientes que recibió romiplostim [316].

- **Eltrombopag**

Se administra por vía oral a la dosis inicial de 50 mg/día, salvo en pacientes de origen asiático o con insuficiencia hepática grave (donde se ha registrado un incremento del riesgo de eventos tromboembólicos), en los que se comenzará con 25 mg/día. Se podrá subir la dosis hasta un máximo de 75 mg/d con el fin de alcanzar un recuento plaquetario $>50 \times 10^9/L$. El tratamiento de mantenimiento se realizará de acuerdo a los recuentos plaquetarios del paciente, oscilando la dosis de eltrombopag entre 25 y 75 mg/día. La respuesta máxima se alcanza a las dos semanas de iniciado el tratamiento. Si se suspende éste, los recuentos de plaquetas vuelven a los valores basales dentro de las 2 semanas siguientes a la suspensión del fármaco [317, 318].

Eltrombopag es una molécula de pequeño tamaño, no peptídica y con capacidad de unirse a la región transmembrana del receptor de la TPO (pero en un sitio diferente a donde lo hace la TPO endógena).

En el estudio de extensión se incluyeron 302 pacientes tratados con eltrombopag para evaluar su seguridad y eficacia a largo plazo. Se observó que el 85,8% de los pacientes alcanzaba una cifra de plaquetas mayor o igual a $50 \times 10^9/L$ en algún momento del estudio sin precisar ningún tratamiento de rescate. Los efectos adversos descritos con mayor frecuencia son leves, destacando la cefalea moderada. Las alteraciones de la función hepatobiliar observadas en algunos pacientes recomiendan la práctica de controles periódicos de las transaminasas, fosfatasa alcalina y la bilirrubina antes de iniciar el tratamiento, cada dos semanas durante el ajuste de la dosis y mensualmente en pacientes con recuentos estables de plaquetas. En la mayoría de los pacientes no se observó asociación entre los efectos tromboembólicos y la cifra de plaquetas, salvo en 3 de ellos. Otro de los efectos adversos a los que se prestó especial interés fue la fibrosis medular, no obstante, en la mayoría de los pacientes el grado de mielofibrosis fue de 0 a 1, y en 11 de ellos se encontró un grado de mielofibrosis de 2 o 3 en al menos una biopsia.

La administración conjunta de eltrombopag con antiácidos y productos lácteos puede disminuir su absorción, por lo que se recomienda distanciar su administración de las comidas. El eltrombopag inhibe los transportadores de membrana (OATP1B1 y BCRP), por lo que podría aumentar la exposición de los fármacos que utilizan estos transportadores, como las estatinas [319].

Switch: Cambio de un agonista por otro

Son numerosos los estudios que demuestran la seguridad y eficacia que supone utilizar un segundo AR-TPO una vez que el primero ha fallado en el mismo paciente. Los trabajos publicados incluyen aproximadamente 50 pacientes cada uno y obtienen una eficacia variable entre el 50% y el 80% en función de cuál fuera la causa que justificara el cambio de un agonista por otro. Si el motivo del cambio era la pérdida de eficacia al primer AR-TPO la tasa de respuesta al switch era más baja (50%). Sin embargo, si la causa del cambio era la aparición de efectos adversos, la tasa de eficacia del cambio fue alrededor al 80%. Entre los factores pronósticos para responder al segundo AR-TPO, caben destacar tanto el tiempo de evolución de la PTI como el número de líneas de tratamiento previas recibidas por el paciente (excluyendo la esplenectomía) [320, 321].

Discontinuación del AR-TPO

En un comienzo se consideraba que los AR-TPO se utilizarían para realizar tratamientos a largo plazo de los pacientes con PTI. A partir del 2011 se empezaron a comunicar casos de pacientes en los que se podía discontinuar el tratamiento al lograrse mantener un recuento estable del número de plaquetas en el paciente.

En los estudios publicados, un 30% de los pacientes pudieron discontinuar el tratamiento con los AR-TPO manteniendo una cifra estable de plaquetas a lo largo del tiempo [322-324]. Los factores predictores para alcanzar una respuesta mantenida tras la supresión del fármaco son: que el paciente se encuentre en fase persistente de la enfermedad, que haya alcanzado una tasa de respuesta completa a los AR-TPO, que tenga un bajo porcentaje de plaquetas reticuladas o inmaduras y que hayan descendido sus niveles plasmáticos de APRIL [273].

Los resultados del estudio de *Al-Samkari et al (2018)*, sugieren que los niveles endógenos de TPO podrían servir para predecir la respuesta al tratamiento con los AR-TPO de acuerdo a sus niveles previos a iniciar la terapia. Este hecho podría ser clínicamente útil, ya que además del recuento plaquetario, los niveles de TPO pueden obtenerse en cualquier momento durante el curso de la enfermedad [325]. Esto es así debido a que el aumento del número de plaquetas resultado del tratamiento con los AR-TPO favorecería el aclaramiento de la TPO plasmática que se encuentra aumentada en los pacientes con PTI al ser internalizada por el receptor Mpl de las plaquetas y MKs.

Otras opciones terapéuticas: Fármacos inmunosupresores

- **Rituximab**

Es un mAc quimérico dirigido contra el receptor CD20 presente en los linfocitos B. Durante la última década se ha utilizado en pacientes con PTI refractaria [326]. Induce apoptosis de los LB o su destrucción en el bazo por citotoxicidad. El resultado es una depleción de LB que se traduce en el descenso del título de Acs antiplaquetarios y, curiosamente, de normalización de los LT alterados en la PTI crónica. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción del rituximab puede deberse a una regulación indirecta del compartimento de células T [239, 327].

Generalmente se administra en infusión intravenosa a la dosis de 375 mg/m²/semana, durante 4 semanas, pero también se han propuesto dosis más reducidas (100 mg/m²/semana). En el único estudio multicéntrico en fase II disponible [328], se observó que, al año de recibir el tratamiento, el 40% de los pacientes tenía un recuento plaquetario de $\geq 50 \times 10^9/L$ y el 33% mantenía cifras elevadas de plaquetas a los dos años. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio aleatorizado [329] en el que se usó la combinación de rituximab y dexametasona en pacientes con diagnóstico nuevo de PTI. Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con dexametasona y rituximab puede ser una opción eficaz antes de indicar la esplenectomía. Respecto a los efectos secundarios del rituximab, son destacables los relacionados con la primera infusión (náuseas, escalofríos, rinitis, urticaria con sensación de sofoco, hipertensión, erupción, fiebre, prurito, irritación de garganta e hipotensión), generalmente leves y transitorios, más infrecuentes en las siguientes dosis y que se reducen y limitan con la premedicación. A pesar de que el tratamiento con rituximab parece ser relativamente seguro, hay evidencia de efectos adversos potencialmente graves, incluyendo reactivaciones de infecciones, síndrome de liberación de citoquinas, distress respiratorio agudo y leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Opciones terapéuticas en la trombocitopenia inmune primaria refractaria

En los casos de pacientes con PTI refractaria en donde no se alcanza o se pierde la respuesta tras el tratamiento de primera y segunda línea y que precisa un tratamiento continuado para evitar el sangrado, se han utilizado fármacos inmunosupresores e inmunomoduladores como el danazol, la dapsona, la ciclosporina, la azatioprina, el micofenolato de mofetilo, la vincristina o la combinación de varios fármacos para su

tratamiento (Tabla 14). Estos fármacos están actualmente en desuso debido a su eficacia limitada y a los importantes efectos adversos que pueden tener.

En pacientes refractarios podría resultar más efectivo y menos tóxico utilizar un tratamiento combinado con fármacos que aumenten la producción plaquetaria y disminuyan su destrucción periférica. De este modo, se evitaría el empleo de monoterapia durante períodos prolongados de tiempo que pudieran aumentar la toxicidad del tratamiento, sin alcanzar ningún tipo de respuesta. En este sentido, se han combinado diferentes inmunosupresores con los AR-TPO, sin quedar muy definido el modo más adecuado para discontinuar con el tratamiento una vez alcanzada la respuesta esperada.

Tabla 14. Inmunosupresores e inmunomoduladores en la PTI refractaria.

Tratamiento	Respuesta inicial	Tiempo hasta la respuesta	Duración de la respuesta	Riesgo/acontecimientos adversos
Azatoprina	40-67%	Lento	≤ 25% tienen respuesta sostenida fuera de terapia	Debilidad, sudoración, hipertransaminasemia, neutropenia grave con infección.
Ciclofosfamida	24-85%	1-16 semanas	≤ 50% tienen respuesta sostenida	Neutropenia, trombosis venosa profunda aguda, náuseas, vómitos, riesgo de neoplasias secundarias
Ciclosporina A	50-80% en pequeños estudios	3-4 semanas	> 50% de los respondedores tienen respuesta sostenida a los 2 años (a dosis bajas)	Astenia, insuficiencia renal; hipertensión, neuropatía, hiperplasia gingival, mialgia, dispepsia, hipertrichosis, temblor inapropiado para ancianos y pacientes con insuficiencia renal
Danazol	≤ 67%	3-6 meses	¿?	Acné, hirsutismo, hipercolesterolemia, amenorrea, hipertransaminasemia
Dapsona	≤ 50%	3 semanas	Respuesta sostenida en ≥ 67% fuera de Tratamiento	Distensión abdominal, anorexia, náuseas, methemoglobinuria; exantema (puede requerir interrupción). Riesgo de anemia hemolítica en pacientes con deficiencia de G6PD
Micofenolato de mofetilo	≤ 75%	4-6 semanas	Corta duración	Cefalea, lumbalgia, distensión abdominal, anorexia, náuseas
Alcaloides de la vinca	Variable 10-75%	5-7 días	¿?	Neuropatía, neutropenia, fiebre, reacciones en el sitio de infusión

Como alternativa al tratamiento de la PTI refractaria también aparecen fármacos como el oseltamivir. El oseltamivir ha sido eficaz en pacientes cuya destrucción plaquetaria se debe a Acs anti-GPIIb. Estos Acs producen una traslocación de la Neu lisosomal plaquetaria que conduciría a una pérdida de ácido siálico y, en última instancia, a la destrucción plaquetaria a través de la unión a los receptores hepáticos AMR. Este mecanismo podría evitarse mediante el uso de un inhibidor de la Neu, como es el caso del oseltamivir fosfato. En este sentido se ha descrito el tratamiento de un paciente con PTI con un tratamiento conjunto de oseltamivir y AR-TPO [330].

Igualmente se sabe que la señalización de la tirosina quinasa del bazo juega un papel fundamental en la destrucción plaquetaria por fagocitosis mediada por Acs en pacientes con PTI al ser un mediador clave de la señal intracelular mediada por Fc γ R en varias células inmunes de naturaleza inflamatoria, incluidos los macrófagos. Así el Fostamatinib, un inhibidor oral de la tirosina quinasa esplénica, se postula como una nueva opción de tratamiento de la PTI. Ha sido aprobado recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) para el tratamiento de la PTI crónica en adultos que han tenido una respuesta insuficiente a una terapia previa (esplenectomía, AR-TPO y/o Rituximab), al obtenerse respuestas clínicamente significativas en estos pacientes. Según los datos del estudio de Bussel et al (2018), los efectos adversos más frecuentes de este tratamiento respecto al grupo placebo fueron diarrea (31% grupo tratado con fostamatinib vs. 15% grupo placebo), hipertensión (28% vs. 13%), náuseas (19% vs. 8%), mareos (11% vs. 8%) y aumento de la ALT (11% vs. 0%) [331].

Además, hay ensayos clínicos abiertos en fase 1/2 (NCT03395210) para evaluar la seguridad y eficacia de PRN1008 en pacientes con PTI. El PRN1008 es un inhibidor covalente reversible oral de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) y actualmente está en desarrollo clínico para el tratamiento de múltiples enfermedades autoinmunes. El BTK tiene un papel importante en la señalización a través de los receptores de las células B así como en las vías donde están implicados los receptores Fc γ R y Fc Σ R. Además, la activación del BTK es crítica tanto para la activación como para la maduración de los linfocitos B y también regula la activación mediada por Acs de otras células inmunes, como macrófagos, neutrófilos y mastocitos a través de la señalización del receptor Fc (C.L. Langrish., et al. *PRN1008, a Reversible Covalent BTK Inhibitor in Clinical Development for Immune Thrombocytopenic Purpura. Blood* 2017 130:1052). En este trabajo se demostró *in vitro* que el tratamiento con PRN1008 inhibía la activación de las células B y bloqueaba la activación mediada por Acs de las células inmunes mediante la señalización del receptor Fc. Este grupo descubrió que el inhibidor de BTK podría disminuir la pérdida de plaquetas de dos modos: reduciendo la destrucción plaquetaria

mediante la inhibición de la señalización de autoanticuerpos/FcγR en los macrófagos esplénicos y al disminuir la generación de autoanticuerpos mediante la inhibición de la activación y maduración de las células B.

2. HIPÓTESIS

Si bien algunos pacientes con PTI presentan trombocitopenia grave, las manifestaciones de sangrado no son tan frecuentes ni tan graves como cabría esperar para los bajos recuentos plaquetarios que presentan. Por tanto, los pacientes con PTI podrían contar con algún mecanismo procoagulante compensatorio que podría disminuir el riesgo y la gravedad del sangrado causado por la trombocitopenia.

Existe gran variabilidad en las manifestaciones clínicas de los pacientes, lo que sugiere variaciones en el grado de participación de los numerosos mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Este hecho también podría explicar la diversidad de la respuesta a los agentes terapéuticos empleados en estos pacientes ya que estos podrían *per se* modificar estos mecanismos. Un ejemplo es el aumento del riesgo de sufrir eventos trombóticos de los pacientes con PTI sometidos a esplenectomía.

3. OBJETIVOS

El objetivo de esta propuesta es caracterizar la hemostasia de los pacientes con PTI, identificar los posibles mecanismos procoagulantes compensatorios de la trombocitopenia y evaluar el efecto del tratamiento con los AR-TPO sobre los mismos.

Para cumplir con nuestro propósito dividiremos los objetivos de la siguiente manera:

1- Caracterizar la hemostasia en pacientes con PTI determinando las características funcionales de las plaquetas circulantes, la cinética de la generación de trombina y de la formación del coágulo.

2- Evaluar los mecanismos procoagulantes que podrían estar estimulados en los pacientes con PTI:

- El nivel de expresión de los receptores de adhesión en la superficie de las plaquetas y su capacidad de activación tras la estimulación con los agonistas.
- La exposición en la superficie plaquetaria de PS y su capacidad para anclar el complejo protrombinasa.
- La capacidad de generar MPs celulares y su capacidad trombogénica.
- La actividad del sistema fibrinolítico.

3- Determinar el efecto de los AR-TPO sobre los mecanismos antes mencionados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El Comité Ético de Investigación en Medicamentos del Hospital Universitario la Paz aprobó el protocolo del estudio y los sujetos fueron incluidos después de la obtención del Consentimiento Informado. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

La información se manejó respetando la legislación española sobre códigos éticos de conducta (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; y Ley 8/2001, del 13 de Julio, de Protección de Datos de Carácter Personal en la Comunidad de Madrid, y a partir del 25 de mayo de 2018 la nueva legislación en la UE sobre datos personales, en concreto el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos).

El sangrado de los pacientes se evaluó de acuerdo a la escala de sangrado de la WHO [263], que ha sido validada como el método estandarizado de registro de sangrados de pacientes con PTI crónica para estudios de investigación y práctica clínica.

4.1 SUJETOS DEL ESTUDIO

Se reclutaron un total de 82 pacientes con PTI primaria crónica según los criterios definidos por Rodeghiero et al 2009, desde septiembre de 2015 hasta diciembre de 2017 en la Sección Hemostasia del Servicio de Hematología del Hospital Universitario la Paz. Cuarenta estaban sin tratamiento desde al menos seis meses antes de realizar el estudio (78% mujeres, edad media de $51,7 \pm 20,1$ años) y otros cuarenta y dos tratados con los AR-TPO durante al menos dos meses antes de realizar el estudio (53% mujeres, edad media de $64,9 \pm 17,4$ años). Ciento doce sujetos sanos (55% mujeres, edad media 57 ± 25 años) reclutados en la Sección de Donantes del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario La Paz también fueron incluidos en el estudio.

Son criterios de inclusión

- Criterios de inclusión para los pacientes con PTI:
 - Pacientes con edad ≥ 18 años, diagnosticados de PTI crónica según los criterios establecidos [261, 266, 332], que estuvieran: a) sin tratamiento desde al menos 6 meses antes de realizar el estudio y b) tratados con los AR-TPO desde al menos 2 meses antes de realizar el estudio y que hayan respondido a la terapia.
 - Pacientes que hayan aceptado participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado.
- Criterios de inclusión para el grupo de controles sanos:
 - Personas con edad ≥ 18 años.
 - Controles que hayan aceptado participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado.

Son criterios de exclusión (para pacientes y controles sanos)

- El embarazo, enfermedad renal o cardíaca graves, enfermedad psiquiátrica activa, hepatopatía crónica, infección recurrente o aguda en los últimos 5 años.
- Que hayan recibido transfusiones de plaquetas o concentrados de hematíes en los últimos 15 días.
- Haber sido diagnosticados de trastorno de la coagulación o trombocitopatía.
- Presencia de Acs antifosfolípidos (Ac anticardiolipina, anti- $\beta 2$ -glicoproteína I y/o anticoagulante lúpico).
- Presencia o sospecha de presencia de cualquier evento trombótico o condición clínica que pudiera interferir en los objetivos planteados en la propuesta.
- Con tratamiento anticoagulante o medicamentos que puedan afectar a la hemostasia tales como: antagonistas de la vitamina K, heparinas, antiinflamatorios no esteroideos, anticonceptivos orales, agentes antiplaquetarios y antidepresivos del tipo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.
- Para pacientes diagnosticados de PTI son criterios de exclusión todo tratamiento para la PTI que no sean los AR-TPO.

4.2.- EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras la firma del Consentimiento Informado, se extrajeron un total de 11 mL de sangre: 3 tubos con citrato sódico al 3,8% (3 x 2,7 ml) y 1 tubo de 3 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Todos los tubos empleados para extraer la sangre fueron Vacutainer® (BD, Becton Dickinson and Company, Madrid, Spain). Dos de los tubos de citrato se procesaron dentro de las 2 horas transcurridas tras la extracción de la muestra (uno se usó para la tromboelastografía y el otro para los estudios de funcionalidad plaquetaria). Posteriormente las muestras se procesaron para obtener el plasma libre de plaquetas (PFP) que se congeló a -80°C hasta su uso.

Para evitar la influencia de los ritmos circadianos en las variables de estudio, la hora de extracción fue la misma para todos los sujetos del estudio (entre las 9 y las 11 horas de la mañana).

Aislamiento de plaquetas

El PRP se obtuvo por centrifugación de la sangre completa (152xg, 10 min, sin freno, a 23 ° C). Para obtener las plaquetas lavadas, el PRP se centrifugó a 650xg durante 2 min a 23° C después de adicionar ácido cítrico-dextrosa (ACD, citrato de sodio 85 mM, ácido cítrico 65 mM y glucosa 104 mM) en una dilución 1:10. El pellet se lavó y se resuspendió en un volumen igual al original del PRP en buffer HEPES 5mM (5 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,42 mM NaH₂PO₄; 1mM MgCl₂; 2mM CaCl₂; 12mM NaHCO₃; 0,35% BSA; 5mM Dextrosa, pH 7.4), junto con el ACD (dilución 1:10) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones previamente descritas.

Aislamiento de plasma libre de plaquetas (PFP)

La sangre entera se centrifugó 15 min a 1000xg y 23°C. Se separó el plasma, que se volvió a centrifugar dos veces más: la primera, 15 min a 1500xg y 23°C y la segunda 2 min a 13.000xg y 23°C.

4.3- CULTIVOS CELULARES

Las células MEG-01 constituyen una línea celular megacarioblástica humana y fueron proporcionadas por el Dr. Redondo (Universidad de Extremadura, Cáceres, España). Estas células se cultivaron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco®, Madrid, España) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) (ICN, Madrid,

España), 100 U/mL de Penicilina G (Gibco®, Madrid, España) y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®, Madrid, España). Las células HepG2 constituyen una línea celular adherente de hepatocarcinoma humano. Estas células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco modified Eagles minimal essential medium) (Gibco®, Madrid, España) suplementado con 10% de FBS (ICN, Madrid, España), 100 U/mL de Penicilina G (Gibco®, Madrid, España) y 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®, Madrid, España).

Ambos tipos celulares se incubaron a 37°C en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂.

4.4 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN PLAQUETARIA

Recuento y determinación del tamaño de las plaquetas

El recuento y el volumen de plaquetas se analizó con un contador de células Coulter Ac-Tdiff® (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

Determinación de plaquetas inmaduras o reticuladas

Las plaquetas reticuladas se determinaron con la técnica previamente descrita por Hayashi et al (1999) [333]. Las muestras de PRP se fijaron con formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron resuspendidas con PBS. A continuación, 50 µL de la muestra se marcó primero con 5 µL de un mAc dirigido contra la subunidad α IIb unido a ficoeritrina (PE) (Biocytex, Marseille, France) y posteriormente con Retic-COUNT® (Thiazole orange; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Las muestras se analizaron por CMF con el citómetro FACScan (BD Biosciences).

Determinación de los niveles de TPO en plasma

El PFP obtenido tras la centrifugación del tubo de sangre recogido en EDTA se conservó a -80°C hasta su análisis. Los niveles plasmáticos de TPO se determinaron mediante la técnica de ELISA, usando un kit comercial (DuoSet-R&D, Minneapolis, MN, USA).

Evaluación de la función plaquetaria.

La activación de las plaquetas se evaluó analizando la activación del receptor de Fg y la exposición de P-selectina y CD63 (marcadores de la liberación de gránulos intraplaquetarios) en la superficie de las plaquetas, en estado basal y tras la activación con agonistas. El PRP se diluyó 1:4 con tampón Walsh 1x (10 mmol/L de HEPES,

145mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl y 1mmol/L de MgSO₄, pH 7,4) y se incubó con buffer (condición basal) o con 100 μ M de TRAP (Péptido Activador del Receptor de Trombina, Bachen, Bubendorf, Suiza) o con 10 μ M de ADP a temperatura ambiente, durante al menos 15 minutos.

Tras la incubación, se añadió PAC1 marcado con fluoresceína (FITC) (Becton Dickinson, Madrid, España), un mAc que reconoce sólo la forma activa del receptor de Fg. Después de 15 minutos de incubación en la oscuridad y a temperatura ambiente, las plaquetas se diluyeron en 250 μ L de PBS para su análisis por CMF con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Biosciences) y se adquirieron 10.000 eventos en la región plaquetaria, que fueron analizados con el software BD Cell Quest Pro TM (Becton Dickinson Biosciences). Para determinar la expresión de P-selectina y de CD63 se utilizaron los mAc anti-P-selectina y anti-CD63 marcados con FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) en estado basal y tras la estimulación con TRAP o ADP.

Evaluación de la expresión de los receptores de adhesión en la superficie de las plaquetas

Las subunidades del receptor de Fg se determinaron utilizando un mAc unido a PE dirigido contra la subunidad α IIb (CD41, Biocytex, Marseille, France) y otro contra la subunidad β 3 (BD Pharmingen). Igualmente el receptor plaquetario para el FVW se analizó utilizando mAc contra las subunidades CD42a y CD42b (BD Pharmingen).

Exposición de PS en la superficie de las plaquetas, unión del complejo protrombinasa (FVaXa) y actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9

La exposición de PS en la superficie plaquetaria se determinó con anexina V marcada con FITC (Becton Dickinson, Madrid, España). Las plaquetas lavadas se resuspendieron en el tampón del Kit de anexina V (10mM HEPES; 10mM NaOH; 140mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; pH 7,4). Posteriormente se añadió la anexina V-FITC y después de incubar la muestra 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, la muestra se analizó por CMF.

La unión del complejo protrombinasa (FXaVa) a la PS de la superficie de plaquetas se evaluó por CMF determinando la unión del FVa y del FXa a plaquetas lavadas. Las plaquetas lavadas (1×10^8 / mL) en estado basal y estimuladas con 100 μ M de TRAP se

incubaron con factor Xa (FXa) (5 nmol/L) y factor Va (FVa) (5 nmol/L) obtenidos de Haemtech Inc (Cellsystems, Alemania). Después de producirse la fijación de los factores FVa y FXa a la PS expuesta en la superficie plaquetaria se agregaron los mAc específicos sin marcar anti-FVa y anti-FXa (0,1 μ mol/L cada uno, Haemtech Inc, Alemania) y un mAc contra la subunidad α IIb marcada con PE (Biocytex, Marseille, France) para marcar la población de plaquetas. Después de lavar se añadió un Ac anti-Ig de ratón conjugado con FITC (DAKO, España). Las muestras se analizaron por CMF.

La actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 en las plaquetas se determinó por CMF (Millipore, Madrid, España) evaluando la escisión de los sustratos fluorogénicos específicos. El método empleado para la cuantificación de la actividad de las caspasas se basa en el empleo de inhibidores de caspasas marcados con un fluorocromo (Fluorochrome Inhibitors of Caspases-FLICA-). Cada FLICA contiene tres dominios con funciones distintas:

- a. El **dominio fluorocromo** (carboxifluoresceína o fluoresceína, FAM).
- b. El **dominio de reconocimiento de la caspasa** que es un péptido de 3 o 4 aminoácidos (DEVD para las caspasas 3/7, LETD para la caspasa 8 y LEHD para la caspasa 9).
- c. El **dominio de unión covalente** que consiste en cloro- o fluoro- metilcetona que se une al residuo cisteína de la respectiva caspasa formando un enlace tiometilcetona que inactiva de forma irreversible (unión covalente) a la enzima. FLICA es permeable a través de la membrana plasmática plaquetaria y no resulta tóxico para las células.

El PRP (5 μ L) se incubó con 80 μ L de Buffer Hepes 5mM y 2,8mM de GPRP acetato (inhibe la interacción del Fg con la membrana de la plaqueta a nivel de la GPIIb-IIIa, evitando la formación de fibrina). Posteriormente las mezclas se incubaron durante 30 minutos con las FLICAS específicas para cada caspasa a temperatura ambiente y en la oscuridad, y posteriormente se analizaron por CMF.

Determinación de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 en la línea celular megacarioblástica humana MEG-01

Para evaluar si existía una relación entre el tratamiento con los AR-TPO y la apoptosis de las plaquetas realizamos experimentos en una línea megacarioblástica humana (MEG-01). Las células MEG-01 (250×10^3 células/mL por condición) se incubaron con medio

(grupo control), con TPO (100 ng/mL) o con romiplostim (53 µg/mL) y la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 se evaluó por CMF a las 72 horas y a la semana del tratamiento.

4.5 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE MICROPARTÍCULAS

La capacidad procoagulante asociada a los PLs de las MPs se determinó con un kit de Zymuphen® (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, Francia) siguiendo las instrucciones de uso. El kit es un test funcional para medir la actividad procoagulante de las MPs presentes en el plasma humano a través de la generación de trombina y de FXa en presencia de un sustrato cromogénico.

Para ello las muestras de PFP, suplementadas con calcio, se introducen junto a FXa e inhibidores de la trombina en los pocillos de la microplaca recubiertos con estreptavidina y anexina V unida a biotina. Las MPs presentes en la muestra se unen a la anexina V a través de los PLs de las MPs. Tras lavar, se adiciona protrombina purificada, FXa-FVa y calcio; que junto con los PLs de las MPs, favorecerán el paso de protrombina a trombina. Hay una relación proporcional entre la concentración de PLs y la cantidad de trombina generada. La trombina actúa sobre un sustrato específico cromogénico y se mide el color desarrollado a una absorbancia de 405 nm. El desarrollo de color se evaluó con un espectofotómetro Multiskan FC® (ThermoScientific, Madrid, España).

4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROCOAGULANTE POR CAT Y ROTEM

Test de generación de trombina: CAT®

Para medir la generación de trombina se utilizó la trombingrafía automática calibrada (CAT®, *Calibrated Automated Thrombogram*, Thrombinoscope). El CAT® es un método fluorimétrico que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación.

El CAT® se realizó en muestras de PPP. Las muestras se descongelaron a 37°C durante 10 minutos. En cada pocillo de la placa se agregaron 20 µL de PPP-Reagent LOW (Thrombinoscope BV®, Maastricht, Holanda) que contiene PLs (concentración final 4 µM) y FT (concentración final 1pM), además de 80 µL de PPP y 20 µL de una solución

tampón compuesta por un sustrato específico de la trombina y CaCl_2 (solución FluCa Kit de Thrombinoscope BV®, Maastricht, Holanda).

La generación de trombina se registra de forma continuada con un fluorímetro Fluoroscanner FL® (Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) (excitación a 390 nm y emisión a 460 nm). Los valores de fluorescencia se correlacionan con la actividad de trombina generada en función del tiempo y se evalúan con el programa Thrombinoscope version 3.6® (Thrombinoscope BV®, Maastricht, The Netherlands). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Con el CAT® se evaluó: el tiempo de latencia (TL), el tiempo al pico (TAP), la altura al pico (AP) y el potencial endógeno de trombina o área bajo la curva (ETP).

Tromboelastometría rotacional: ROTEM®

El ROTEM® (Pentapharm, Munich, Germany) es un método viscoelastométrico útil para estudiar la cinética de la formación del coágulo y la fibrinólisis, proporcionando una información global del componente celular, de las proteínas pro y anticoagulantes, y de las interacciones entre ambos componentes.

El ROTEM® se realizó en PRP ajustado a 25×10^9 plaquetas/L con el plasma del mismo individuo. La cinética de la formación del coágulo se evaluó con el test "NATEM". Para la realización del test se añadieron a la cubeta de reacción: 300 μL de PRP ajustado y 20 μL de una solución de CaCl_2 (0,2M: reactivo NATEM).

Los parámetros obtenidos de este test fueron:

-Tiempo de coagulación (CT = tiempo que transcurre desde el inicio de la medición hasta que comienza a formarse el coágulo, en segundos).

-Tiempo de formación del coágulo (CFT= es el tiempo que transcurre desde el inicio de la determinación hasta que se forma un coágulo de 20 mm de amplitud, en segundos).

-Ángulo α (α = es el ángulo de la tangente a la curva del coágulo de 2 mm de amplitud. En grados (°) informa de la tasa de polimerización de la fibrina).

-Fortaleza máxima del coágulo (MCF= refleja en mm cuál es la fortaleza máxima del coágulo generado).

4.7 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA FIBRINOLISIS

Se utilizaron kits cromogénicos para determinar los niveles plasmáticos de PAI-1, t-PA, u-PA y α 2-antiplasmina y el % de actividad de TAFI. En todos los casos se emplearon muestras de PPP, siguiendo las instrucciones de uso de los respectivos Kits comerciales. El color desarrollado se midió con un espectofotómetro Multiskan FC[®] with incubator (ThermoScientific, Madrid, Spain). El activador del plasminógeno humano tipo uroquinasa (u-PA) y la E-selectina se analizaron empleando Kits de R&D Systems Europe Ltd[®]. (Abingdon, United Kingdom); el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el PAI-1 fueron medidos empleando Kits de eBioscience[®] (Hatfield, United Kingdom) y el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI) se determinó usando un Kit comercial de American Diagnostica[®] (Pfungstadt; Germany).

Contenido intracelular de PAI-1 en la línea celular megacarioblástica humana MEG-01

Las células MEG-01 se cultivaron de forma simultánea en tres condiciones distintas (300×10^3 células/mL por condición): grupo control (sin adición de fármacos), tratadas con TPO (100 ng/mL) y tratadas con romiplostim (53 μ g/mL). Las muestras se recogieron al comienzo y después de 24, 48 y 72 horas de incubación para determinar el contenido intracelular de PAI-1.

El contenido endógeno de PAI-1 en células MEG-01 se determinó por Western blot. Las células lavadas se lisaron con tampón Triton (Triton X-100 al 1%, Tween-20 al 0,05%, NaCl 300 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM en solución salina tamponada con fosfato [PBS]) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA libre; Roche, Barcelona, España). Después de la electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reducidas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con una celda de transferencia semiseca Trans-blot[®] (Bio-Rad, Madrid, España). Las membranas se incubaron primero con un mAc contra el PAI-1 y luego con un mAc contra la tubulina como control de carga de la muestra (ambos Acs de Santa Cruz Biotech Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU). Posteriormente, las membranas se incubaron con un Ac contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia (Merck, Madrid, España) y se realizaron los correspondientes análisis densitométricos con el software de imagen UVITEC[®] Cambridge. Alliance 2.7.

4.8 EVALUACIÓN DE LA PÉRDIDA DE ÁCIDO SIÁLICO DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLAQUETARIA

El patrón de glicosilación y la pérdida de ácido siálico de las GPs de la membrana plaquetaria se evaluaron de forma indirecta mediante la determinación de su contenido de β -galactosa y GLcNAc (N-acetilglucosamina). Las plaquetas lavadas se trataron con FITC-Erythrina cristagalli (ECA; EY Laboratories) o con FITC-WGA para determinar, respectivamente, la β -galactosa o la β GLcNAc por CMF.

Para evaluar la captación de las plaquetas por las células de hepatocarcinoma humano (HepG2) a través de los receptores hepáticos de Ashwell-Morell, 100×10^3 células HepG2 se transfirieron a cada pocillo 24 horas antes de realizar el experimento y se incubaron durante 24h a 37°C con medio de cultivo DMEN (reconstituido con suero bovino fetal). A las 24 horas se quitó el medio de cultivo, se lavaron las células adheridas con PBS, se añadió 500 μ L de medio libre de suero por pocillo, y se incubó durante 30 min a 37°C antes de agregar las plaquetas lavadas de controles y de pacientes (5×10^7 plaquetas/100 μ L de HEPES 5mM) pre-marcadas con CMFDA-FITC (4,8 μ M). Las células HepG2 y las plaquetas se cocultivaron durante 1 hora a 37°C con ligera agitación. Después de quitar el medio y de lavar las células hasta 2 veces con PBS, las células adheridas se despegaron con tripsina al 0,25%. Tras recoger y lavar las células, el pellet de células con las plaquetas fagocitadas marcadas con CMFDA-FITC se resuspendieron en 300 μ L con PBS y se analizaron por CFM.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar o como la mediana y el rango (percentil 25-75) según la distribución de la población fuese o no normal. Para evaluar la normalidad de la muestra de datos se utilizó el test de Shapiro-Wilk. Según la distribución de los datos se utilizó el test de Studen o el test de Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos, el ANOVA de un factor o el test de Krustal-Wallis no paramétrico con test post-hoc de Dunn para comparar entre más de dos grupos y el test de correlación de Pearson o el de Spearman para el cálculo de la asociación entre las variables. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 17 (SPSS, Chicago, IL) y valores de p menores o iguales de 0,05 se consideraron significativos. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el apoyo de la Unidad de Estadística del Hospital Universitario La Paz, IDIPaz.

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas y clínicas de los pacientes

En las siguientes tablas podemos ver las características y los datos demográficos de los pacientes con PTI crónica sin tratamiento (Tabla 15) y las de los pacientes tratados con los AR-TPO (Tabla 16).

Tabla 15. Características clínicas y demográficas de los pacientes sin tratamiento para la PTI en el momento del estudio.						
Nº	EDAD (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamiento Previo	Tratamiento concomitante	Nº Pts (x 10⁹/L)
1	24	F	7	Corticoides, IgIV	Sulfato Ferroso	33
2	18	M	1	Corticoides, IgIV	NO	116
3	23	F	2	IgIV	NO	41
4	49	F	3	NO	NO	54
5	55	F	18	Corticoides, IgIV	NO	17
6	92	F	3	Corticoides, IgIV	Carvedilol	45
7	67	F	4	Corticoides, IgIV	NO	180
8	69	M	4	NO	NO	22
9	75	F	1	NO	Hidroclorotiazida Irbesartán	38
10	45	F	3	Corticoides, IgIV	NO	158
11	56	F	7	NO	NO	53
12	62	M	2	Corticoides, IgIV	NO	170
13	67	M	2	NO	NO	47
14	61	F	17	Corticoides, IgIV	Ranitidina	49
15	80	F	2	Corticoides, IgIV	Rabeprazol, Carvedilol, Paracetamol/Tramadol hidrocloruro, Simvastatina, Gliclazida, Candesartán, Tetrazepam, Ibuprofeno, Carbonato cálcico, Calcitriol , Bifosfonatos, Hierro- sacarosa	123
16	84	M	6	NO	NO	130
17	55	M	8	Corticoides, IgIV	NO	175
18	54	F	18	Corticoides, IgIV	NO	22
19	85	F	18	Corticoides, IgIV	NO	68
20	46	F	16	Corticoides, IgIV	NO	20

21	46	F	14	Corticoides, IglV	NO	79
22	23	M	15	Corticoides, IglV	NO	28
23	21	M	1	Corticoides, IglV	NO	51
24	76	F	21	NO	NO	37
25	75	F	1	NO	Enalapril, Ezetimiba	53
26	26	F	4	NO	NO	53
27	40	F	16	Corticoides, IglV	NO	243
28	40	F	2	NO	NO	139
29	44	F	2	NO	NO	89
30	46	F	2	Corticoides, IglV	NO	33
31	42	F	1	NO	NO	33
32	69	F	16	NO	Rifaximina, Levotiroxina , Verapamilo, Levocetirizina dihidrocloruro, Bromaze pam Atorvastatina, Trimetazidina, Olmesartán medoxomilo , Clortalidona, Vitaminas B1-B6-B12, Ácido alendrónico, Beclometasona dipropionato, Montelukast	32
33	35	F	5	Corticoides, IglV	NO	66
34	36	F	1	Corticoides	NO	107
35	79	M	25	Inmunosupresores	NO	109
36	49	M	2	NO	NO	95
37	54	F	1	NO	NO	68
38	35	F	9	NO	NO	149
39	25	F	5	Corticoides	Propranalol	50
40	40	F	1	Corticoides, azatioprina	Diazepam, Clonazepam	146

Tabla 16. Características clínicas y demográficas de los pacientes tratados con AR-TPO.

Nº	EDAD (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamiento actual (AR-TPO)	Tiempo tratado con el tto actual (meses)	Tratamiento previo	Esplenectomía (Año)	Tratamiento concomitante	Nº Pts (x 10 ⁹ /L)
1	40	F	9	Eltrombopag 50 mg/d	20	IgIV, Corticoides	NO	Lamivudina, Abacavir, Doutegravir, Fluconazol, Espironolactona	22
2	30	M	20	Eltrombopag 25mg/d	49	IgIV, Corticoides	NO	NO	55
3	77	M	25	Romiplostim 8 µg/kg/7 d	44	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por aumento de transaminasas)	NO	Metformina, Ivabradina, Atorvastatina, Pantoprazol	45
4	47	F	6	Eltrombopag 50 mg/d	34	IgIV, Corticoides	NO	Levotiroxina, Omeprazol	354
5	58	F	37	Romiplostim 10 µg/Kg/7 d	55	IgIV, Corticoides, Inmunosupresores y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por pérdida de la respuesta)	SI (1984)	Calcio pidolato/Colecalciferol, Lorazepam	27
6	40	M	16	Romiplostim 4 µg/kg/7 d	28	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por refractariedad)	NO	Celecoxib, Hidrocloruro de tramadol/Paracetamol, Omeprazol	133
7	45	M	9	Romiplostim 1 µg/kg/d	6	IgIV, Corticoides, Rituximab y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por refractariedad)	NO	NO	225
8	46	M	10	Romiplostim 1 µg/kg/d	19	IgIV, Corticoides, Rituximab y Eltrombopag	NO	NO	311

						Se suspende el tratamiento por refractariedad			
9	85	M	18	Romiplostim 10 µg/kg/2 d +IVIgs/2 d	30	IgIV, Corticoides	NO	Enalapril	166
10	88	M	21	Eltrombopag 25 mg/d	19	IgIV, Corticoides y Romiplostim (Se suspende el tratamiento por refractariedad)	NO	Enalapril, Darbepoetina alfa	226
11	43	M	41	Romiplostim 1 µg/kg/d	47	IgIV, Corticoides, Azatioprina, Rituximab y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por pérdida de respuesta)	SI (1980)	Interferón pegilado, Ribavirina, Boceprevir	119
12	81	M	5	Prednisona 20 mg + Eltrombopag 25 mg/d	12	IgIV, Corticoides y Rituximab	NO	Perindopril, Paracetamol	281
13	71	M	14	Eltrombopag 25 mg/d	53	IgIV, Corticoides, y Azatioprina	NO	NO	109
14	72	M	15	Eltrombopag 75 mg/d	68	IgIV, Corticoides, Dapsona y Azatioprina	NO	NO	117
15	73	M	16	Romiplostim 10 µg /kg/7 d + Corticosteroides 10 mg/2 d	8	IgIV, Corticoides, Dapsona, Azatioprina y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por pérdida de respuesta)	NO	NO	39
16	41	F	13	Eltrombopag 5 mg/d	23	IgIV, Corticoides	SI (2013)	NO	99
17	75	F	12	Eltrombopag 75 mg/d	38	IgIV, Corticoides	NO	NO	57

18	76	F	13	Eltrombopag 75 mg/d	49	IgIV, Corticoides	NO	NO	40
19	78	M	6	Eltrombopag 25 mg/72h	2	IgIV, Corticoides	SI (¿?)	Omeprazol, Metformina, Carvedilol, Paroxetina,Digo xina	351
20	75	M	16	Eltrombopag 25 mg/d	30	IgIV, Corticoides	NO	Omeprazol, Celecoxib , Silodosina Paracetamol	86
21	84	M	7	Eltrombopag 25 mg/72h	15	IgIV, Corticoides	NO	Atorvastatina, Aantoprazol, Sulfato Ferroso	97
22	82	F	36	Romiplostim 8 µg /Kg/7d	39	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por toxicidad hepática)	NO	Sulfato Ferroso, Omeprazol, Candesartan, Atorvastatina, Timolol	60
23	18	F	6	Eltrombopag 25 mg/d	2	IgIV, Corticoides y Romiplostim (Se suspende el tratamiento por pérdida de respuesta)	NO	NO	30
24	74	F	3	Romiplostim 2 µg/kg/2 d	2	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende por toxicidad hepática.	NO	Levotiroxina, Fluoxetina, Hidrocloruro de tramadol/Parac etamol, Lorazepam, Omeprazol, Enalapril, Calcifediol Etoricoxib	116
25	60	F	23	Eltrombopag 25 mg/d	26	IgIV, Corticoides	NO	NO	66
26	61	F	24	Eltrombopag 50 mg/d	40	IgIV, Corticoides	NO	NO	172
27	75	M	3	Eltrombopag 50 mg/día	17	IgIV, Corticoides	NO	Diltiazem, Paracetamol Furosemida, Sinvastatina, Alopurinol, Nitroglicerina Cafenitrina, Lorazepam	260

28	85	F	29	Romiplostim 1 µg /kg/7 d	40	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por falta de respuesta)	NO	Calcifediol Alendronato	93
29	66	F	14	Eltrombopag 50 mg/d	12	IgIV, Corticoides, Rituximab	NO	Diosmina Bromazepam , Lorazepam	157
30	79	M	1	Eltrombopag 75 mg/d	12	IgIV, Corticoides	NO	Magnesio	79
31	51	F	6	Eltrombopag 25 mg/d	28	IgIV, Corticoides	NO	NO	77
32	74	F	1	Romiplostim 6µg /kg/ 7d	10	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por falta de respuesta)	NO	NO	146
33	62	M	13	Eltrombopag 75 mg/d	2	IgIV, Corticoides	SI (2003)	Simvastatina, Alopurinol, Omeprazol, Metformina, Prednisona	110
34	64	M	3	Romiplostim 6 µg /kg/2 d	16	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por falta de respuesta)	NO	NO	98
35	81	F	5	Eltrombopag 25mg/72h	11	IgIV, Corticoides	NO	Enalapril, Atorvastatina	73
36	45	F	3	Eltrombopag 25 mg/72h	17	IgIV, Corticoides	NO	Atenolol, Ácido desoxicólico, Omeprazol.	55
37	79	F	13	Eltrombopag 25 mg/d	54	IgIV, Corticoides, Rituximab y Romiplostim (Se suspende el tratamiento por falta de respuesta)	NO	Omeprazol, Citalopram	260
38	81	M	8	Eltrombopag 50 mg/d	20	IgIV, Corticoides, Rituximab	NO	Perindopril, Paracetamol, Prednisona,	281

39	79	F	4	Eltrombopag 25 mg/d	32	IgIV, Corticoides	NO	NO	179
40	59	F	20	Romiplostim 8 µg /kg/7 d	24	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por falta de respuesta)	NO	Levotiroxina	57
41	47	F	6	Romiplostim 7 µg /kg/7 d	2	IgIV, Corticoides y Eltrombopag (Se suspende el tratamiento por falta de respuesta)	NO	NO	359
42	77	F	14	Eltrombopag 25 mg/48 h	10	IgIV, Corticoides y Dapsona	SI (2003)	Olmesartan medoxomilo/ Amlodipino Captropil Metmorfina	63

5.2 Plaquetas totales y plaquetas inmaduras en los distintos grupos de pacientes

La figura 24 muestra que los pacientes con PTI tenían menos plaquetas que los individuos sanos y más plaquetas inmaduras, no observándose diferencias entre ambos grupos de pacientes con PTI.

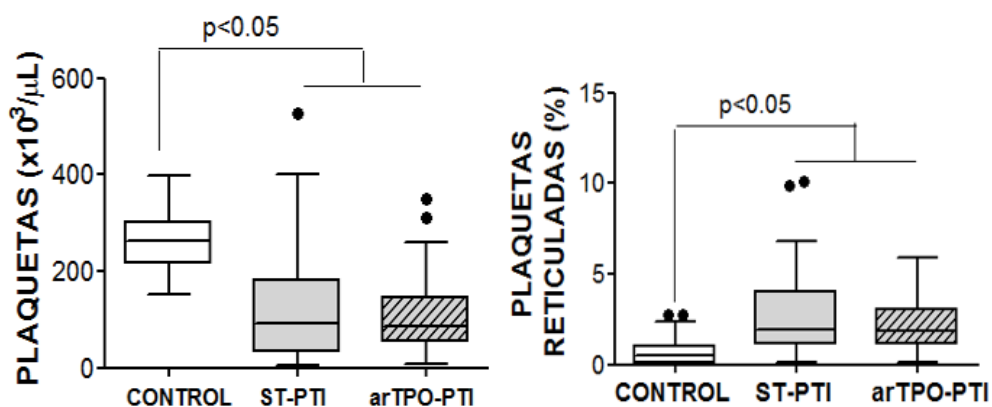


Figura 24. Recuento de plaquetas y porcentaje de plaquetas reticuladas o inmaduras en los diferentes grupos de estudio por CMF. Comparación entre grupos realizadas por Kruskal-Wallis de un factor con el test a posteriori de Dunn.

5.3 Estudio de los niveles de trombopoyetina en los diferentes grupos de estudio

Con el objetivo de analizar el mecanismo de regulación de la producción de plaquetas por la TPO, se cuantificaron los niveles de esta hormona en los distintos grupos de estudio. Como se muestra en la Figura 25 los niveles plasmáticos de TPO en los dos grupos de pacientes con PTI son mayores que en el grupo control.

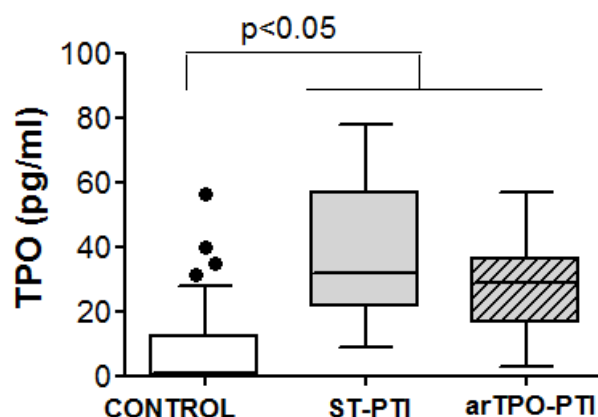


Figura 25. Niveles plasmáticos de TPO determinados por ELISA. Comparación entre grupos realizadas por Kruskal-Wallis de un factor con el test a posteriori de Dunn.

5.4 Cinética de formación del coágulo mediante tromboelastometría

Estudiamos la cinética de la formación del coágulo por tromboelastometría (ROTEM®) en PRP ajustado a 25.000 plaquetas por microlitro (Figura 26). Los pacientes con PTI sin tratar tenían alargado el CT y un menor ángulo α que el grupo control. Por el contrario, no hubo diferencias en el CT ni en el ángulo α entre los controles y los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI). La fuerza máxima del coágulo (MCF) fue mayor en las muestras de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO y la lisis del coágulo a los 60 minutos (LY60) fue menor que en el grupo control, destacando el perfil procoagulante de los pacientes tratados con los AR-TPO.

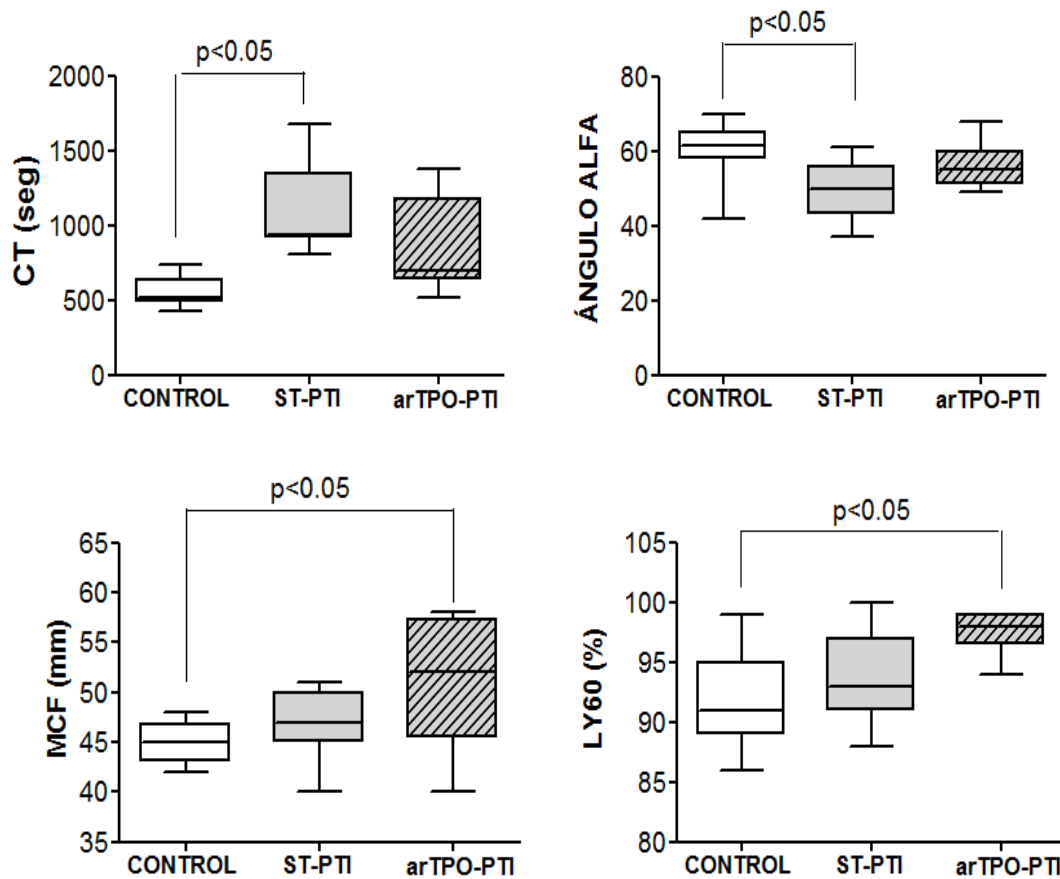


Figura 26. Resultados de la tromboelastometría rotacional (ROTEM®). La comparación entre grupos se realizó realizada con el test de Kruskall-Wallis de un factor y con el test a posteriori de Dunn.

5.5 Estudio de la actividad procoagulante del plasma

Para intentar justificar si el perfil procoagulante observado en el ROTEM® de los pacientes tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) podría deberse a la mayor capacidad de generar trombina del plasma de estos pacientes, se realizó el CAT® en muestras de PPP con el reactivo PPP-Reagent LOW. No hubo diferencias entre los distintos grupos en el tiempo de latencia ó *lagtime* (TL), pero sí un aumento en el ETP y en el pico (AP) en los dos grupos de pacientes de PTI respecto de los controles sanos (Figura 27).

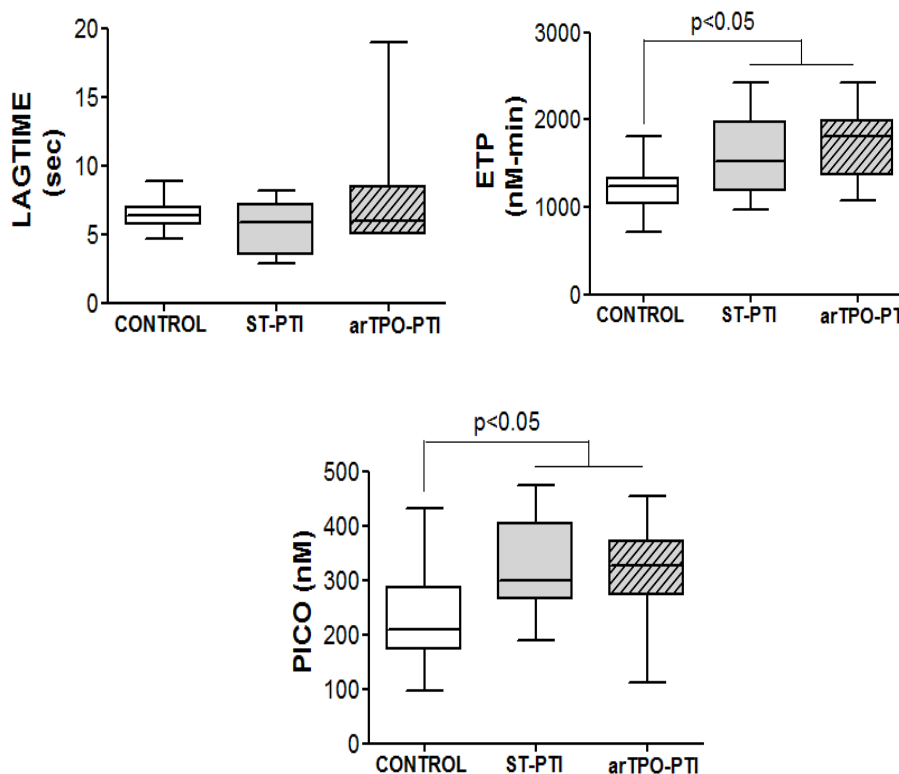


Figura 27. Valores obtenidos en la Trombinografía Automática Calibrada (CAT®). La comparación entre grupos se realizó con el test de Kruskal-Wallis de un factor y con el test a posteriori de Dunn.

5.6 Estudio de la capacidad de activación plaquetaria

Se estudió la capacidad de activación plaquetaria con el objeto de determinar si las plaquetas eran responsables de las diferencias encontradas en los parámetros del ROTEM® entre los distintos grupos. No se encontraron diferencias entre los grupos en el estado de activación basal de las plaquetas. Por el contrario, tras la activación con TRAP o con ADP las plaquetas de los pacientes con PTI sin tratamiento (ST-PTI) y tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) unieron menos PAC1 que el grupo control (Figura 28).

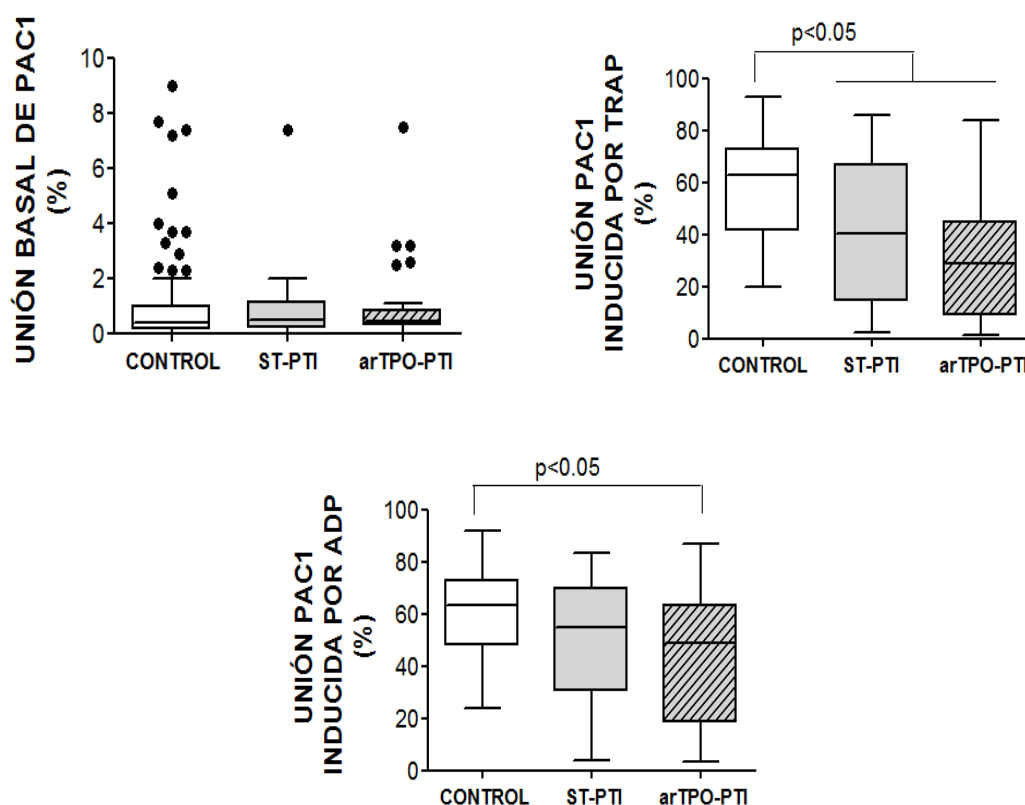


Figura 28. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas en condiciones basales y tras la estimulación con TRAP (100 μ M) y ADP (10 μ M). La unión de PAC1 se determinó por CMF y los resultados se expresaron como % de células positivas. Comparación entre grupos realizada por Kruskal-Wallis de un factor con el test a posteriori de Dunn.

Las figuras 29 y 30 muestran la capacidad de las plaquetas de liberar el contenido de sus gránulos α (marcador: P-selectina) y densos (marcador: CD63) en situación basal y tras ser estimuladas con TRAP y ADP. Las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) expresaban más P-selectina en condiciones basales que las del grupo control y las de los pacientes con PTI sin tratar (ST-PTI). Tras la activación con TRAP, pero no con ADP, las plaquetas de todos los pacientes con PTI expusieron menos P-selectina que el grupo control. La exposición de CD63 tras la estimulación de TRAP también fue menor en las plaquetas de los pacientes con PTI que en las del grupo control.

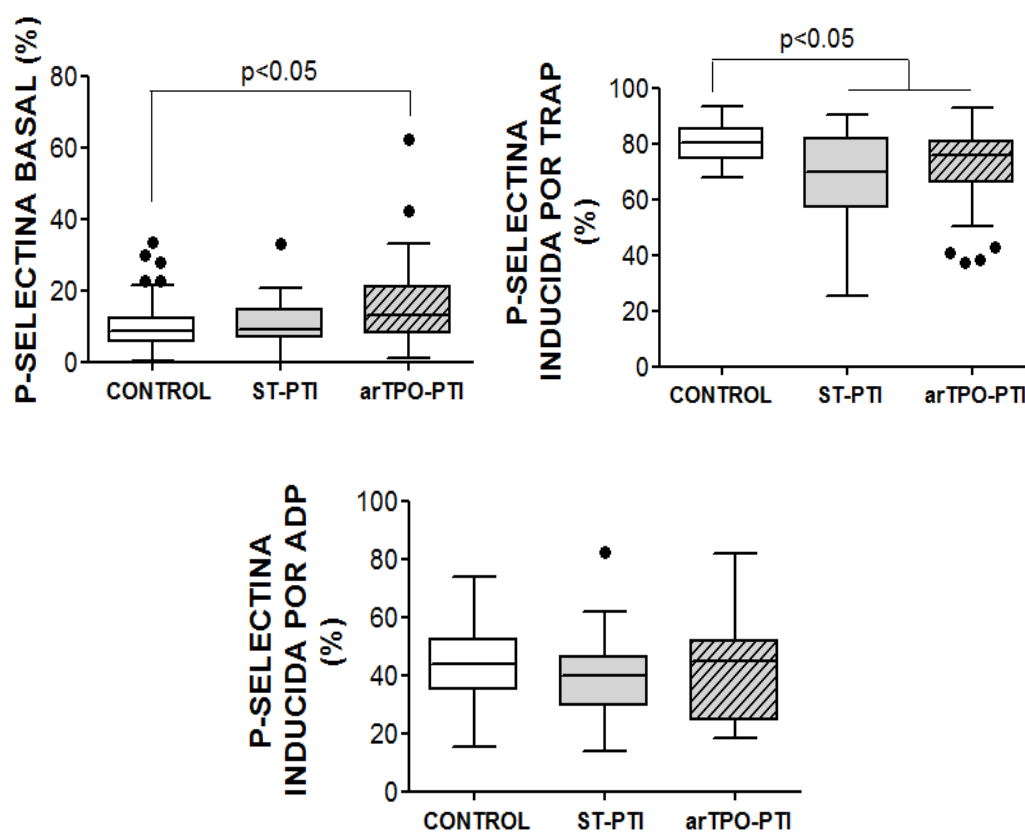


Figura 29. Exposición de P-selectina en la superficie de las plaquetas en condiciones basales o estimuladas con TRAP (100 μ M) y ADP (10 μ M). La unión de un mAc específico contra la P-selectina se evaluó por CMF y los resultados se expresaron como % de células positivas. El análisis estadístico entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y s el test a posteriori de Dunn.

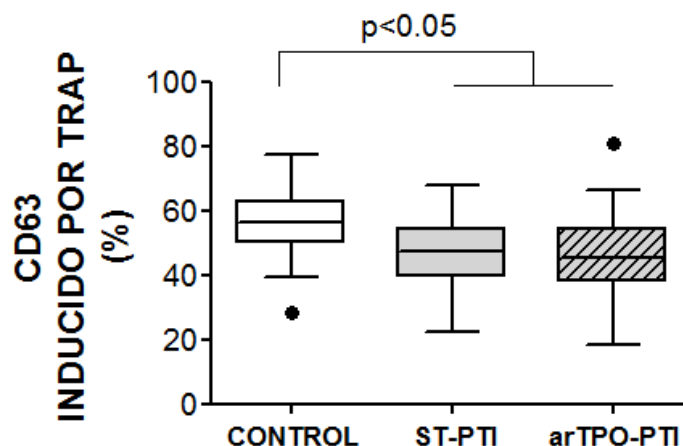


Figura 30. Expresión de CD63 en la superficie de las plaquetas tras la estimulación con TRAP 100 μ M. La unión de un mAc específico contra el CD63 se evaluó por CMF y los resultados se expresaron como % de células positivas. La comparación estadística entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y el test a posteriori de Dunn.

5.7 Expresión del receptor del fibrinógeno y del receptor para el factor de von-Willebrand en la superficie de las plaquetas

Para determinar si la disminución en la capacidad de activación de las plaquetas se debía a un déficit en los receptores de Fg en su superficie, se determinó la expresión de este receptor en los diferentes grupos (Figura 31). Para ello evaluamos la expresión de las subunidades $\alpha 2b$ y $\beta 3$ que conforman el receptor del Fg en las plaquetas y sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la subunidad $\beta 3$ (CD61), que es mayor en los grupos de pacientes con PTI respecto al grupo control. No hubo diferencias significativas en la expresión de la subunidad $\alpha 2b$ (CD41b) del receptor de Fg en ninguno de los grupos de pacientes con PTI en comparación al grupo control. Esto indica que la menor activación de las plaquetas de los pacientes con PTI no se debió a un déficit en la expresión de este receptor.

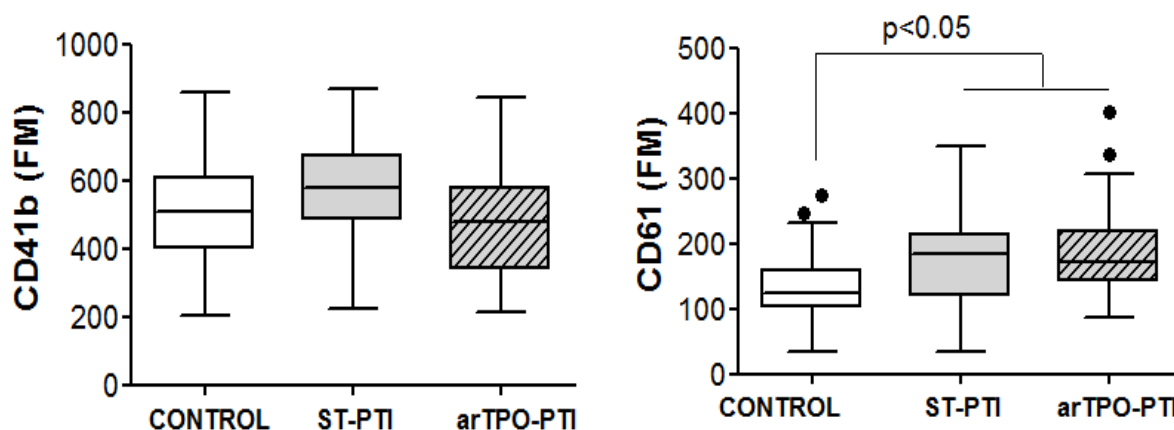


Figura 31. Expresión del receptor de Fg en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con los mAbs específicos contra la subunidad α Ib (panel de la izquierda) y contra la subunidad β 3 (panel de la derecha). La unión de los Abs se determinó por CMF. Los resultados se expresan como fluorescencia media (FM). La comparación estadística entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

También evaluamos la expresión del receptor plaquetario para el FVW en la superficie de las plaquetas (Figura 32). Los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) expresan más receptor para el FVW que las plaquetas del resto de los grupos.

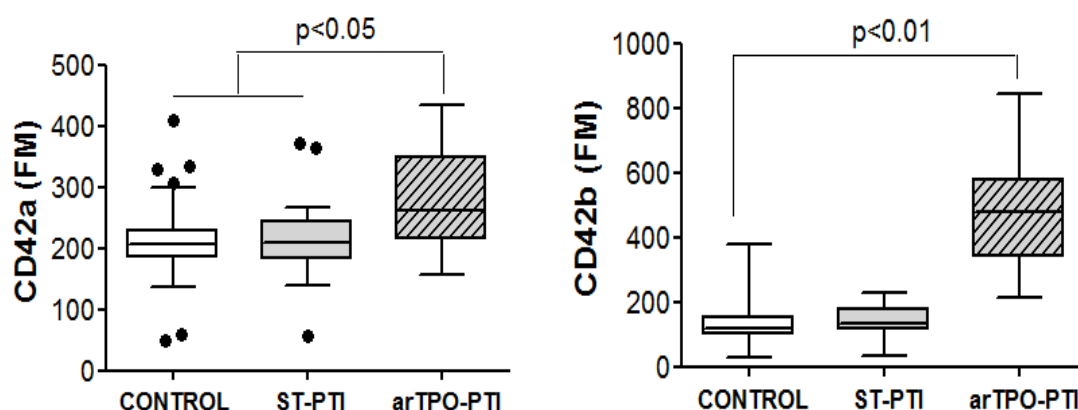


Figura 32. Expresión de las subunidades CD42a y CD42b del receptor para el FVW en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con los mAb específicos contra la subunidad CD42a (panel de la izquierda) y contra la subunidad CD42b (panel de la derecha). La unión de los Abs se determinó por CMF y los resultados se expresaron como fluorescencia media (FM). La comparación estadística entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

5.8 Apoptosis de las plaquetas de los pacientes con PTI

Como los pacientes con PTI presentaban una actividad plaquetaria anómala decidimos estudiar la apoptosis en las plaquetas de estos pacientes. Para esto evaluamos la exposición de PS en condiciones basales determinando la unión de anexina V. Las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) exponían más PS en su superficie que las plaquetas de los controles sanos (Figura 33).

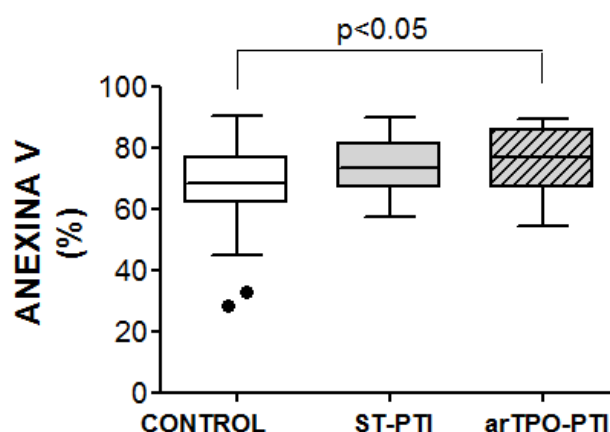


Figura 33. Exposición de PS en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas de los individuos se incubaron con Anexina V marcada con FITC en condiciones basales y se analizaron por CMF. Los resultados se expresaron como % de células positivas. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis de un factor con el test a posteriori de Dunn.

5.9 Unión del complejo de protrombinasa a las plaquetas en condiciones basales

Evaluamos si la PS expuesta en la superficie plaquetaria era funcional para el anclaje del complejo protrombinasa (FVaXa) y por tanto pudiera justificar el perfil hipercoagulable del ROTEM® obtenido en este grupo de pacientes. En la Figura 34 observamos que la unión del complejo protrombinasa está aumentado en los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI).

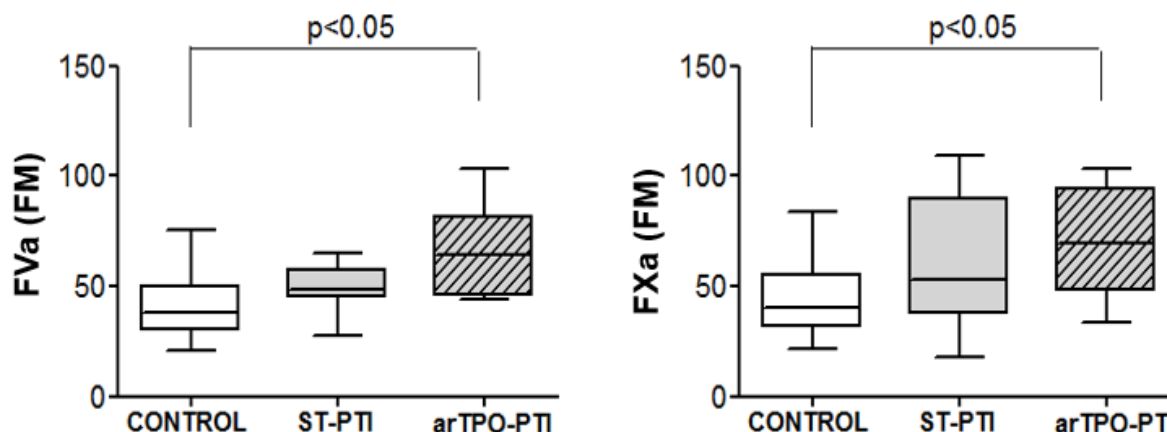


Figura 34. Unión del complejo protrombinasa (FVaXa) a la PS expuesta en la superficie de las plaquetas. Su análisis se hizo por CMF y los resultados se expresaron como fluorescencia media (FM). La comparación entre los grupos se realizó por el test de Kruskal-Wallis de un factor y el test a posteriori de Dunn.

5.10 Actividad de las caspasas en las plaquetas y en la línea celular megacarioblástica humana (MEG-01)

Con el objeto de evaluar si la mayor exposición de PS observada en la superficie de las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO se correspondía con una mayor apoptosis en sus plaquetas, determinamos la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 por CMF. La Figura 35 muestra que la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 está aumentada en las plaquetas de los pacientes tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI).

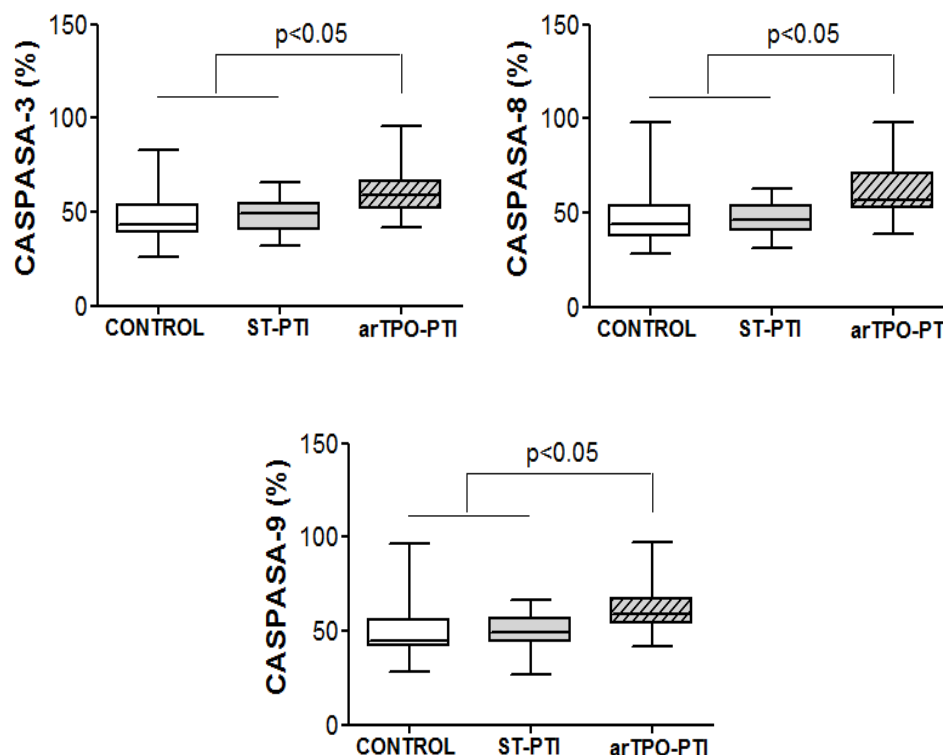
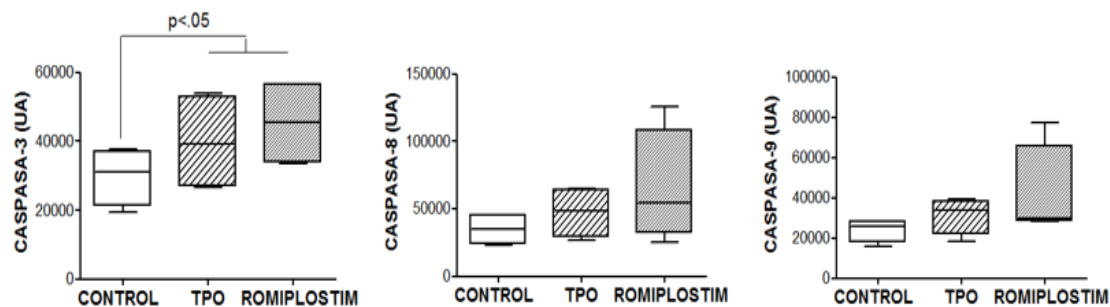


Figura 35. Actividad de las caspasas de las plaquetas. La actividad de las caspasas se evalúa por CMF según se describe en materiales y métodos. Los resultados se expresaron como % de células positivas. El análisis estadístico se realizó con el test de Kruskal-Wallis de un factor y con el test a posteriori de Dunn.

Para determinar si el tratamiento con los AR-TPO era el responsable del aumento de la apoptosis observado en las plaquetas de los individuos con PTI sometidos a ese tratamiento, estudiamos el efecto *in vitro* de la TPO y del romiplostim en células MEG-01. Para ello se analizó por CMF la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 en las células MEG-01 sin tratar (grupo control) y tratadas con TPO o con romiplostim durante 72 horas y 1 semana. A las 72 horas la actividad de la caspasa 3 fue mayor en los grupos de MEG-01 tratados con TPO y con romiplostim. Tras una semana, la actividad de la caspasa 3 fue igual en todos los grupos. Por el contrario, la actividad de las caspasas 8 y 9 a las 72 horas fue similar en todos los grupos, pero a la semana fueron mayores en los grupos tratados con TPO y con romiplostim (Figura 36).

A Tratamiento de 72 h



B Tratamiento de 1 semana

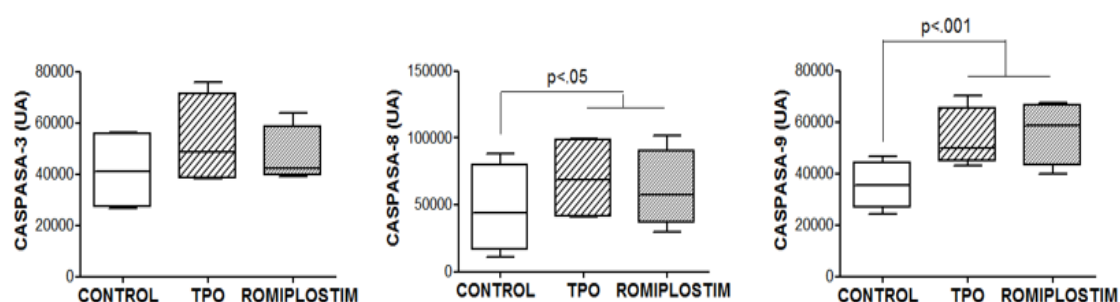


Figura 36. Actividad de caspasas en la línea celular megacarioblástica MEG-01 a las 72h y a la semana de tratamiento con TPO y romiplostim. La actividad de las caspasas se evaluó por CMF según se describe en materiales y métodos. Los resultados se expresaron como UA (Unidades arbitrarias). La diferencia entre grupos se analizó con el test de Kruskal-Wallis de un factor con el test a posterior de Dunn.

5.11 Evaluación de la capacidad trombogénica de las micropartículas

La apoptosis celular induce la liberación de MPs, elementos con alta capacidad trombogénica. Por este motivo evaluamos la capacidad procoagulante de las MPs y su potencial implicación en el perfil hipercoagulable del grupo de pacientes tratados con los AR-TPO observado en el ROTEM®. La figura 37 muestra que los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) tenían mayor capacidad trombogénica asociada a MPs que el grupo sin tratamiento (ST-PTI) y que los individuos sanos.

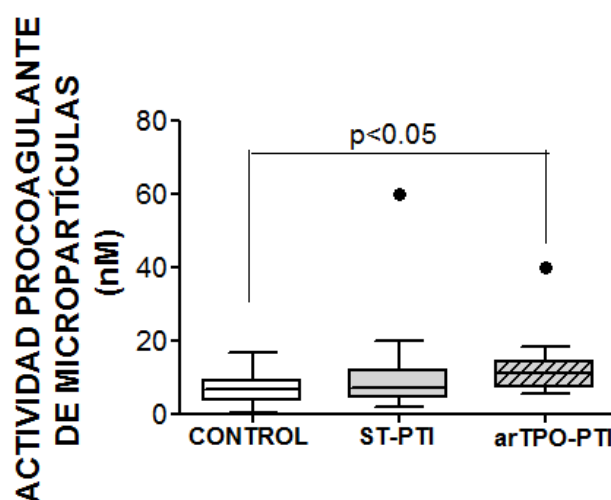


Figura 37. Actividad procoagulante asociada a MPs. El PFP preparado según se indica en Materiales y Métodos se analiza con el kit de ZYMUPHEN que evalúa la capacidad procoagulante asociada a la PS de las MPs. La comparación entre grupos se realizó por Kruskal-Wallis y se usó el test a posteriori de Dunn.

5.12 Proteínas relacionadas con la fibrinólisis

Se determinaron los niveles plasmáticos de t-PA y u-PA, así como la actividad de TAFI en el plasma y no hubo diferencias entre los grupos (Tabla 17).

Por el contrario, observamos un aumento en los niveles plasmáticos y en el contenido plaquetario de PAI-1 en muestras del grupo de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (Figura 38), lo que podría justificar el perfil hipofibrinolítico de estos pacientes observado en el ROTEM®.

	u-PA (pg/mL)	TAFI (% de actividad)	t-PA (pg/mL)
CONTROL	658.2±181.2	32.9±4.9	641.1±425.8
ST-PTI	911.7±309.5	29.4±6.2	665.4±184.6
arTPO-PTI	620.6±11.03	34.3±7.2	708.7±130.5

Tabla 17. Proteínas participantes en la fibrinólisis. Los datos se expresan como valores medios \pm desviación estándar. El análisis estadístico realizado fue el test ANOVA de un factor y test a posteriori de Dunn

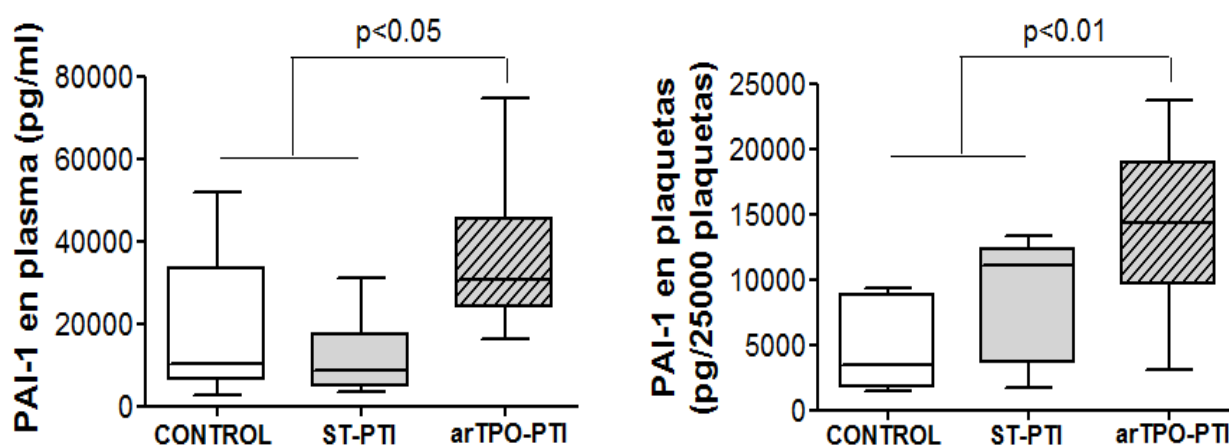


Figura 38. Determinación de los niveles de PAI-1 en plasma y plaquetas. Los niveles de PAI-1 (pg) se midieron en PPP y en PRP ajustado a 25.000 plaquetas, siguiendo las recomendaciones del kit comercial empleado. Comparación entre grupos realizada por el test Kruskal-wallis de un factor con el test a posteriori de Dunn.

5.13 Efecto del tratamiento con AR-TPO en el contenido de PAI-1 en células MEG-01

Con el fin de determinar si el tratamiento con los AR-TPO era responsable del aumento en el contenido de PAI-1 plaquetario, se realizaron experimentos en células MEG-01 incubadas con tampón o con TPO o romiplostim. Tanto la TPO como el romiplostim aumentaron el contenido endógeno de PAI-1 en las células MEG-01 (Figura 39).

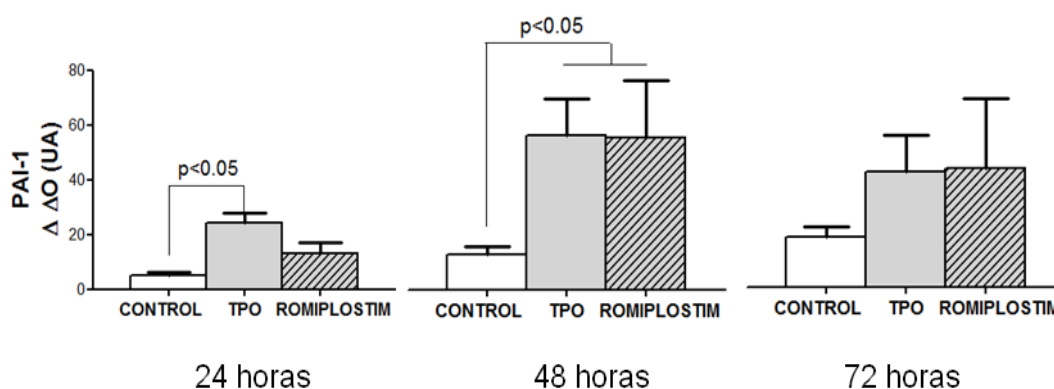


Figura 39. Niveles endógenos de PAI-1 en células MEG-01. Las células MEG-01 se incubaron en tampón (control) o con TPO (100 ng/ml) o con romiplostim (53 µg/ml). La expresión intracelular de PAI-1 se analizó mediante western blot como se describe en Materiales y Métodos. Se realizó el análisis densitométrico de las bandas y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (UA). La comparación entre grupos se realizó con el test Kruskal-Wallis de un factor y con el test a posteriori de Dunn.

5.14 Caracterización del patrón de glicosilación y de la pérdida del ácido siálico de las GPs de la membrana plaquetaria

La figura 40 muestra que las GPs de las plaquetas de los pacientes de PTI sin tratar (ST-PTI) contienen menos ácido siálico (unen más de ECA), mientras que la de los pacientes tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) tienen más βGLcNAc (unen más WGA).

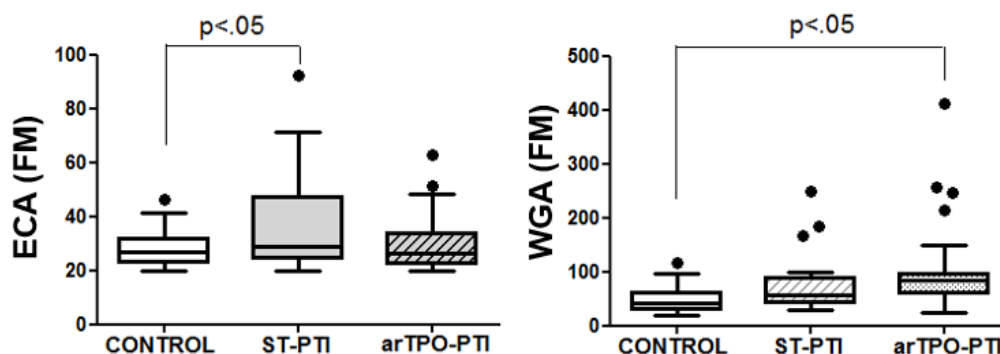


Figura 40. Unión de las lectinas FITC-ECA y FITC-WGA a las GPs de las plaquetas. Su evaluación se realizó por CMF y los resultados se expresan como fluorescencia media (FM). La comparación entre grupos se realizó con el test de Kruskal-Wallis de un factor y con el test a posteriori de Dunn.

Existen referencias que indican que la pérdida de ácido siálico hace a las plaquetas susceptibles de ser captadas por los receptores hepáticos AMR. Como nuestros resultados experimentales mostraron que las plaquetas de algunos pacientes con PTI tenían menos ácido siálico (mayor unión de ECA), se volvió a citar a estos pacientes para evaluar si sus plaquetas eran susceptibles de ser captadas por las células HepG2. La Figura 41 muestra que las plaquetas con menor contenido de ácido siálico en sus GPs de membrana eran captadas en mayor medida por las células HepG2.

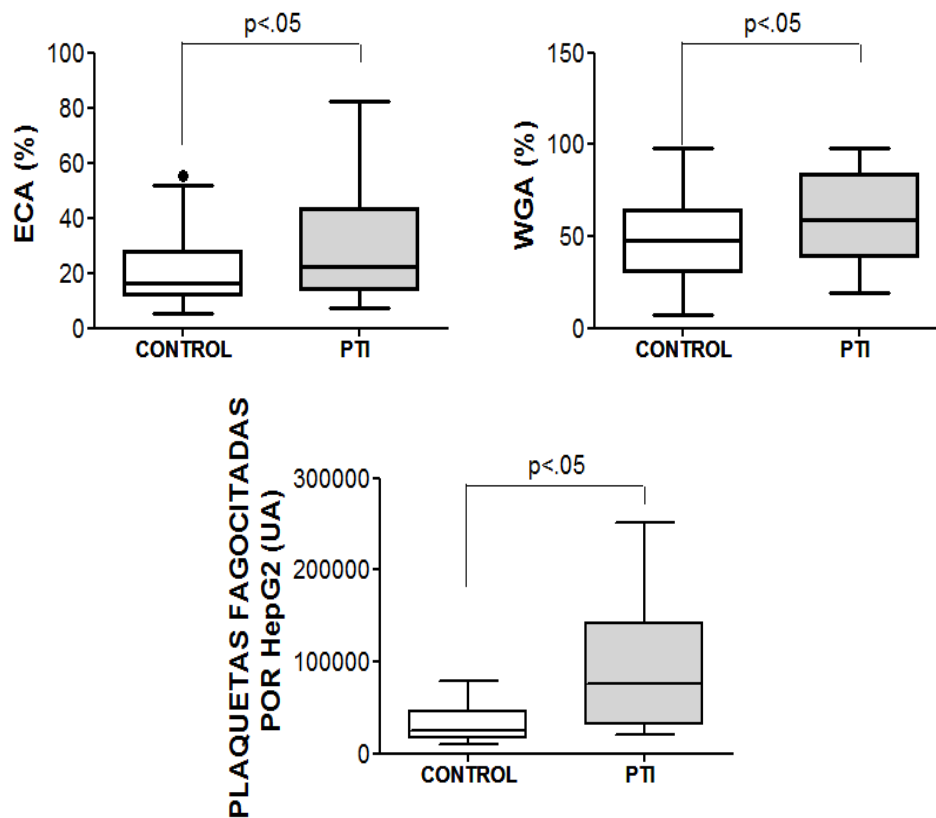


Figura 41. Unión de lectinas a las GPs de plaquetas y fagocitosis de plaquetas por las células HepG2. Unión de FITC-ECA y FITC-WGA a las GPs plaquetarias (paneles superiores) y captación de plaquetas por células HepG2 (panel inferior). La comparación entre grupos se realizó con el test de Man-Whitney.

Se observó una correlación entre la unión de las lectinas WGA y ECA a las GPs de la membrana plaquetaria y su fagocitosis por el modelo celular propuesto (Tabla 18).

Plaquetas fagocitadas por HepG2 (%)	ECA (%)	WGA (%)
	$r = 0,4662$	$r = 0,5779$
	$p < 0,05$	$p < 0,01$

Tabla 18. Relación entre el % de unión de las lectinas ECA y WGA a las GPs de la membrana plaquetaria y el % de plaquetas fagocitadas por la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2. Se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y de la variable estadística “p” cuando esta es significativa ($p < 0.05$). Prueba de Spearman.

6. DISCUSIÓN

Estudios recientes refieren que los pacientes con PTI crónica tienen ciertas características protrombóticas y mayor riesgo de sufrir eventos tromboembólicos [334-336]. Sin embargo, no se ha proporcionado todavía una explicación detallada de los mecanismos involucrados en este fenómeno.

Un estudio de *Álvarez Román et al (2016)*, realizado en pacientes con PTI crónica tratados con diferentes agentes terapéuticos, mostró que los pacientes con PTI tenían un perfil procoagulante respecto a los controles sanos. No obstante se observó una amplia variabilidad en los parámetros de la cinética de formación del coágulo en dichos pacientes [272]. Varios laboratorios han descrito que ciertos tratamientos podrían tener más riesgo de producir complicaciones trombóticas que otros [304, 337, 338]. Por este motivo, las variaciones observadas en el trabajo de *Álvarez Román et al (2016)*, podían deberse a que en este estudio se analizaron de forma conjunta los datos de pacientes que estaban en tratamiento con diferentes fármacos [272].

Entre las terapias farmacológicas más recientes para el tratamiento de segunda línea de la PTI se encuentran los AR-TPO (Romiplostim, Nplate®, Amgen, Thousand Oaks, CA, EE.UU; y Eltrombopag, Promacta®, Revolade®, GlaxoSmithKline, Londres, Reino Unido) [339]. Según está descrito en la literatura, los pacientes de PTI tratados con los AR-TPO tienen asociado un riesgo, pequeño pero significativo, de sufrir procesos trombóticos [315, 340], que son aún más importantes en aquellos pacientes sometidos previamente a esplenectomía [341] o con comorbilidad asociada. Teniendo en cuenta que el uso de los AR-TPO para tratar la PTI y otras trombocitopenias está cada vez más extendido [342-344], en esta propuesta intentamos dilucidar los mecanismos implicados en el efecto procoagulante que tienen estos agentes terapéuticos para comprender las características hemostáticas globales de los pacientes de PTI tratados con los AR-TPO y tenerlas en cuenta a la hora de decidir el tratamiento de los pacientes con PTI.

6.1 Recuento de plaquetas en los distintos grupos experimentales

En la actualidad el criterio para evaluar el grado de respuesta al tratamiento y el seguimiento de los pacientes con PTI no utiliza exclusivamente el recuento plaquetario, sino que tiene en cuenta los síntomas clínicos del paciente [345]. Si bien en los pacientes de PTI incluidos en nuestra cohorte de estudio el número de plaquetas era menor que en los controles sanos, ninguno presentó clínica hemorrágica. De este modo se logró cumplir el objetivo del tratamiento de los

pacientes con PTI que consiste en alcanzar un recuento plaquetario que garantice la seguridad del paciente y evite la aparición de eventos hemorrágicos importantes [346].

6.2 Niveles plasmáticos de TPO y plaquetas inmaduras

La TPO es la hormona responsable de la diferenciación de los MKs en plaquetas durante la megacariopoyesis [347, 348].

Los resultados de nuestra cohorte de pacientes mostraron que tanto en los pacientes de PTI sin tratamiento (ST-PTI) como en los tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI), los niveles plasmáticos de TPO estaban aumentados respecto al grupo de controles sanos. Esto es así debido a que el bajo número de plaquetas sería insuficiente para eliminar la TPO circulante a través de sus receptores TPOR ó Mpl, lo que daría como resultado unos niveles plasmáticos más elevados de TPO [46]. Por otra parte se ha demostrado que la unión de plaquetas envejecidas (que han perdido ácido siálico ó plaquetas desializadas) al receptor hepático de Ashwell-Morell (AMR) induciría la producción de ARNm de TPO hepática, lográndose un sistema de retroalimentación positiva que aumentaría los niveles plasmáticos de TPO para inducir la producción plaquetaria tras su unión al receptor Mpl de los MKs como sistema de compensación [46]. Nuestros resultados se ven respaldados por los datos obtenidos por el estudio de *Álvarez Román et al (2014)*, donde se demuestra que en el momento en el que los pacientes experimentan una recuperación en el número de plaquetas, los niveles plasmáticos de TPO disminuyen [349], confirmando el sistema de regulación anteriormente expuesto.

El aumento de los niveles plasmáticos de TPO en nuestra cohorte de pacientes con PTI induciría una aceleración de la megacariopoyesis con la consecuente liberación de plaquetas reticuladas o inmaduras [350-352].

Las plaquetas reticuladas o inmaduras se caracterizan porque son liberadas a la circulación conteniendo pequeñas cantidades de ácidos nucleicos en su interior (ARN), que pueden conservar durante un corto periodo de tiempo. Su porcentaje (IPF% ó *Immature Platelets Fraction*) se utiliza como un marcador útil para monitorizar la velocidad de producción plaquetaria, es decir, como marcador de la actividad megacariopoyética medular [353, 354]. En diferentes trabajos se ha descrito que el porcentaje de plaquetas inmaduras aumenta en enfermedades cardiovasculares, enfermedades mieloproliferativas y en patologías que cursan con un aumento de la

destrucción periférica de plaquetas (PTI, la púrpura trombótica trombocitopénica, el lupus eritematoso sistémico, la cirrosis hepática...) [355].

Ambos grupos de pacientes con PTI incluidos en nuestro estudio tenían más plaquetas inmaduras que el grupo de controles sanos, lo que sugiere una megacariopoyesis parcialmente eficaz (con aumento en la velocidad de producción plaquetaria, pero no lo suficiente para compensar la destrucción periférica) en estos pacientes. Este aumento de las plaquetas inmaduras podría entenderse como una respuesta medular a la destrucción periférica de las plaquetas [356, 357].

Las plaquetas inmaduras son más grandes y más reactivas que las plaquetas maduras y varios trabajos sugieren que uno de los motivos por los que los pacientes con PTI tienen un fenotipo hemorrágico leve a pesar de su baja cifra de plaquetas, es su alto porcentaje de plaquetas reticuladas [333].

6.3 Técnicas globales para evaluar la hemostasia: resultados del ROTEM

Para asegurar la fiabilidad del análisis y los resultados obtenidos del ROTEM®, el número de plaquetas se ajustó en el PRP de ambos grupos de pacientes con PTI y en los controles sanos. Eso nos permitió asegurar que las diferencias obtenidas en el ROTEM® no se debían a una diferencia en el recuento de plaquetas.

Los análisis obtenidos del ROTEM® demostraron que los pacientes que no recibían tratamiento (ST-PTI) en el momento del estudio tenían tanto un retraso en la formación del coágulo (alargamiento del CT) como una reducción de la velocidad de formación del mismo (disminución del ángulo α) en comparación con el grupo de controles sanos, mientras que en los pacientes respondedores a los AR-TPO (arTPO-PTI) estos parámetros eran similares a los de los individuos sanos. Además, la tromboelastometría de los pacientes tratados con los AR-TPO mostró un aumento del MCF (mayor fortaleza del coágulo) y del LY60 (mayor resistencia a la fibrinólisis) respecto al grupo control. Esta disminución en la fibrinólisis podría explicarse, por un lado, por el aumento de la resistencia a la PC (datos no mostrados) [272], así como por el aumento de los niveles plasmáticos de PAI-1 y de las MPs circulantes en estos pacientes, análisis que fueron realizados en este trabajo.

La mayor MCF observada en los pacientes tratados con los AR-TPO podría estar relacionada con la propia reactividad plaquetaria de estos pacientes. Los pacientes

con PTI tienen más plaquetas inmaduras y éstas son más reactivas que las maduras. Sin embargo, esto no puede explicar el aumento del MCF en el grupo respondedor a los AR-TPO ya que el porcentaje de plaquetas inmaduras se encuentra igualmente aumentado en ambos grupos de pacientes.

6.4 Activación y funcionalidad plaquetaria

Uno de los receptores más importantes implicados en la funcionalidad plaquetaria es el receptor de Fg, por lo que su activación es fundamental para lograr una correcta hemostasia [358]. La capacidad de activación por TRAP del receptor de Fg de las plaquetas en ambos grupos de pacientes con PTI fue inferior a la de las plaquetas del grupo control. Sin embargo, la activación plaquetaria con ADP sólo estaba disminuida en el grupo de pacientes tratados con los AR-TPO. Este hecho diferencial puede deberse a que haya alguna diferencia en la funcionalidad de los gránulos plaquetarios, ya que el ADP se acumula en ellos y se libera tras la activación plaquetaria [359].

La menor capacidad de activación del receptor de Fg en el grupo de pacientes con PTI podría deberse a una disminución en el número de receptores de Fg presentes en la membrana de las plaquetas. Por este motivo evaluamos por CMF la expresión superficial de las dos GPs que forman el receptor de Fg: la GPIIb (α IIb ó CD41b) y la GPIIIa (β 3 ó CD61). No se encontraron diferencias con los controles en los niveles de la GPIIb pero sí hubo una mayor expresión de la subunidad GPIIIa en ambos grupos de pacientes con PTI. Estos hechos descartan que la menor reactividad plaquetaria de las plaquetas de los pacientes con PTI se debiese a que posee menos receptores de Fg.

La P-selectina expuesta en la superficie plaquetaria podría facilitar la interacción de las plaquetas en condiciones basales con otro tipo de células sanguíneas de la serie blanca a través de su receptor PSGL-1 [360-362]. Las plaquetas de los pacientes tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) en condiciones de reposo expusieron más P-selectina en su superficie que las de los pacientes sin tratamiento (ST-PTI) y controles sanos, y esto podría explicar en parte la mayor MCF observada en los pacientes con PTI respondedores a los AR-TPO. Se ha referido que la interacción de la P-selectina con el receptor PSGL-1 induciría la liberación de MPs procoagulantes y el aumento del FT en los monocitos, modulando así la amplificación del trombo [363]. La P-selectina posee un efecto protrombótico y puede desempeñar un papel importante tanto en la inflamación como en la aterosclerosis [364, 365], por lo que unas concentraciones

altas de P-selectina se asocian con un mayor riesgo de trombosis venosa y se pueden usar como marcador predictivo de trombosis [366, 367]. En nuestra cohorte ningún paciente desarrolló un evento trombotico venoso o arterial, por lo que no fue posible evaluar el valor predictivo específico de la P-selectina en pacientes tratados con los AR-TPO para desarrollar trombosis.

Frelinger et al (2018), informaron que las plaquetas de la población pediátrica con PTI sometidas a diferentes terapias exponían más P-selectina en condiciones de reposo, pero después de la estimulación con ADP exponían menos que los controles en su superficie [360]. Estos autores propusieron que la reducción de la capacidad de activación del receptor de Fg y de liberar P-selectina de los gránulos tras activación podría ser consecuencia de la presencia de autoanticuerpos plaquetarios que provocarían la activación plaquetaria y la liberación de contenido de P-selectina de los gránulos α plaquetarios al medio [368] o de una desensibilización de la respuesta plaquetaria al activador ADP. Esta última explicación parece ser la más plausible ya que no se detectaron plaquetas activadas en condiciones basales, y aproximadamente en el 30-40% de los casos no se detectaron niveles de Acs antiplaquetarios, ya sea debido a la falta de robustez de los test empleados para su detección o debido a que, aparte de los mecanismos ya expuestos, podría haber otros adicionales que explicaran esta situación [209]. *Garabet et al (2017)*, también observaron niveles más altos de P-selectina soluble en el plasma de pacientes de PTI tras el tratamiento con los AR-TPO y propusieron su contribución al aumento del riesgo de eventos tromboticos en estos pacientes [369].

La disminución de la activación del receptor de Fg por agonistas y un mecanismo de degranulación anómalo tras la estimulación con TRAP (liberación de la P-selectina de los gránulos α y de CD63 de los gránulos densos), junto a la marcada trombocitopenia presente en algunos pacientes, podría explicar en parte el fenotipo hemorrágico de alguno de los pacientes con PTI.

La expresión superficial de la subunidad GPIb del receptor plaquetario para el FvW disminuye cuando la plaqueta se activa, ya que dicho receptor sería proteolizado y/o internalizado como resultado de la activación [370-373]. La translocación de la subunidad GPIb está potenciada por un mecanismo contráctil que involucra la movilización de Ca^{2+} , la polimerización de actina y la incorporación de miosina en el citoesqueleto cuando el receptor de trombina PAR-1 y el PAR-4 son estimulados con trombina y/o TRAP [371]. No obstante, esta situación no justificaría la sobreexpresión

de las subunidades CD42a y CD42b del receptor para el FVW encontrada en las plaquetas de pacientes tratados con los AR-TPO, dado que su cuantificación tiene lugar sobre la plaqueta en estado basal y no en estado activado. Futuros estudios son necesarios para encontrar una explicación detallada a este nivel.

Se ha descrito recientemente que la presencia de GPIb (CD42b) interviene en la producción de TPO por el hígado [47]. Sin embargo, el aumento en la expresión de CD42b observado en los pacientes de PTI tratados con AR-TPO no parece participar en el aumento de TPO plasmático observado en estos pacientes, ya que los niveles de esta hormona están incrementados en la misma magnitud en ambos grupos de pacientes de PTI y los de CD42b sólo en los pacientes tratados con AR-TPO.

Las pruebas de funcionalidad plaquetaria realizadas por CMF mostraron que la capacidad de activación del receptor de Fg está alterado en la misma medida en las plaquetas de ambos grupos de pacientes de PTI y por tanto no podría justificar la trombogenicidad observada en el perfil del ROTEM® de los pacientes tratados con los AR-TPO. No obstante, la mayor expresión de P-selectina observada en la superficie de las plaquetas en reposo en pacientes tratados con los AR-TPO, sugiere que el sistema de degranulación plaquetaria de los gránulos α de estos pacientes está alterada y podría ser otro factor implicado en la mayor MCF observado en la tromboelastometría.

6.5 Apoptosis de las plaquetas de los pacientes con PTI

Las plaquetas de los pacientes con PTI presentan más signos de apoptosis que las de los controles sanos [213]. La externalización de PS en la superficie de las plaquetas que sufren apoptosis es una señal de *eat me* que induce su eliminación y aclaramiento por el sistema retículoendotelial, empeorando la trombocitopenia de estos pacientes [374, 375].

Nuestros resultados concuerdan con los de *Deng et al (2017)* [213], y mostraron que las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) tenían una apoptosis mayor que las de los pacientes sin tratamiento (ST-PTI) y las de los controles sanos. Por el contrario, *Mitchell et al (2014)* [376], refirieron que la terapia con los AR-TPO en pacientes con PTI inducía una resistencia plaquetaria a la apoptosis y, en consecuencia, provocaba un aumento de la vida media circulante de las plaquetas. Esta diferencia con nuestros resultados podría deberse a que en el

trabajo de *Mitchell et al (2014)*, los pacientes habían recibido tratamiento con los AR-TPO únicamente durante 14 días, mientras que los pacientes incluidos en nuestra cohorte fueron sometidos a la terapia con los agonistas durante al menos 2 meses (el tiempo medio de tratamiento fue de 26 meses). En otro trabajo, *Goette et al (2016) [377]*, no encontraron diferencias significativas en la exposición basal de PS en la superficie plaquetaria ni en la actividad de la caspasa 3 entre las plaquetas de pacientes con PTI sin tratamiento o sometidos a terapias con fármacos distintos de los agonistas y las plaquetas de individuos sanos. Por el contrario, estos autores observaron una disminución en la actividad apoptótica de las plaquetas de 3 pacientes sometidos a terapia con eltrombopag. Tal y como los autores discutieron, este efecto podría deberse a la activación de la vía de señalización de supervivencia Akt observada durante la primera semana de tratamiento con los AR-TPO, lo que también difiere con el tiempo de tratamiento con los AR-TPO de nuestra cohorte de pacientes. Este efecto “antiapoptótico” desaparecía en la segunda semana de tratamiento [376].

La exposición de PS en la superficie plaquetaria también aumenta tras la activación de las plaquetas por diferentes agonistas [378]. Tal y como se demostró previamente, las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con AR-TPO presentaron una disminución en su capacidad de activación, por lo que la activación no podía justificar el aumento en la de PS observado en la superficie de las plaquetas de estos pacientes. En apoyo a que el aumento en la exposición de PS producida por el tratamiento con los AR-TPO se debía a una inducción de la apoptosis en las plaquetas, observamos un incremento en la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 de las plaquetas en los pacientes tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) respecto al grupo no tratado (ST-PTI) y a los controles sanos. Las caspasas son cisteinil-aspartato-proteasas responsables de la expresión en la superficie celular de señales que implican daño celular, como es la exposición de PS en el exterior de las células [13, 379, 380]. Para verificar si los AR-TPO podían ser los responsables del aumento de la apoptosis de las plaquetas, probamos *in vitro* los efectos de romiplostim y de TPO en una línea celular megacarioblástica humana altamente indiferenciada (MEG-01), capaz de generar partículas similares a plaquetas [376]. Observamos que la TPO y el romiplostim indujeron la maduración de las células MEG-01 y produjeron un aumento de la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9 en dicha línea celular megacarioblástica que fue tiempo-dependiente. Resultados similares fueron reportados por *López et al (2015) [381]*, quienes observaron una mayor actividad de la caspasa 9 en las MEG-01 tras 6 días de tratamiento con TPO.

La PS expuesta en la superficie de las plaquetas proporciona una estructura de carga negativa que favorece la unión de complejos enzimáticos de la coagulación (proceso

dependiente de calcio), y proporciona una superficie catalítica para el anclaje de los complejos tenasa y/o protrombinasa para, consecuentemente, generar trombina [382]. El aumento en la exposición de PS en la superficie de las plaquetas de los pacientes de PTI tratados con los AR-TPO podría favorecer dicho mecanismo y así inducir un perfil procoagulante en estos pacientes. En apoyo a esta hipótesis nuestros resultados mostraron que la mayor expresión de PS se acompañaba de una mayor unión del FVa y del FXa a las plaquetas de los pacientes en tratamiento con los AR-TPO. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que las plaquetas de los pacientes con SMD presentaban más signos de apoptosis y unían más FVa y FXa [383], confirmando la capacidad funcional de las plaquetas más apoptóticas de unir más complejo protrombinasa.

En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento prolongado con los AR-TPO induciría un estado proapoptótico en las plaquetas de los pacientes que permitiría un aumento de la unión de los factores de coagulación con el consecuente incremento en el riesgo de sufrir un evento trombótico.

6.6 Capacidad trombogénica de las micropartículas

Los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) tenían una mayor capacidad procoagulante asociada a los PLs de las MPs que los pacientes de PTI sin tratamiento (ST-PTI) y que los controles sanos. Los PLs aniónicos de la superficie de las MPs liberadas [384] ofrecen una superficie catalítica que favorece el anclaje de diferentes factores de coagulación, facilitando así la generación de trombina y la formación del trombo [16-18]. Este hecho sería otra razón que aumentaría el perfil protrombogénico de estos pacientes.

El estudio de *Álvarez Román et al (2016)*, demostró un aumento en el número total de MPs circulantes en una cohorte de pacientes de PTI que incluía tanto individuos sin tratar como sometidos a diferentes tratamientos. El origen celular de las MPs eran las plaquetas y los glóbulos rojos. Las MPs derivadas de las plaquetas se correlacionaban inversamente con el recuento plaquetario [272]. Este hecho sugiere que las MPs generadas son fundamentalmente de origen plaquetario como consecuencia de la apoptosis aumentada de las plaquetas de los pacientes tratados con los AR-TPO.

Otros grupos también describieron la presencia de MPs circulantes de origen plaquetario en pacientes con PTI y han demostrado que los pacientes de PTI con mayores recuentos de MPs CD42b⁺ (MPs de plaquetas) tenían un riesgo menor de

sufrir sangrados [385], pero mayor de sufrir eventos tromboembólicos [386]. Además, otros estudios proponen a las MPs circulantes de origen plaquetario como una de las posibles causas de trombosis en muchas enfermedades debido a su actividad procoagulante asociada [387, 388].

Con respecto a las propiedades procoagulantes de las MPs derivadas de glóbulos rojos, se ha informado que tienen una actividad hemostática amplia al mejorar la hemostasia primaria y secundaria [386]. Este efecto sobre la coagulación se debía a la exposición de PS e inicio de la generación de trombina de forma independiente de FT pero dependiente de FXII [389].

Se ha descrito que la liberación de MPs también se produce por activación celular, pero este no parece ser el mecanismo que las origina en los pacientes con PTI ya que, como mencionamos antes, la capacidad de activación de las plaquetas de estos pacientes esta disminuida. Las MPs circulantes induciría la formación de un coágulo de fibrina más compacto y menos susceptible a la fibrinólisis, lo que justificaría, al menos en parte, el estado hipofibrinolítico observado con el ROTEM® en los pacientes tratados con los AR-TPO [272, 349].

6.7 Características procoagulantes del plasma

Para evaluar si el perfil procoagulante observado en los pacientes tratados con los AR-TPO podía deberse a algún componente del plasma, se realizó el CAT® en muestras de PPP. El plasma de los pacientes de PTI incluidos en ambos grupos presentó una actividad procoagulante aumentada (aumento del ETP y Pico) comparado con el grupo de controles sanos. De acuerdo a las condiciones en que se realizaron los experimentos del CAT® (Reactivo PPP reagent-Low rico en FT y PLs), las características procoagulantes del plasma de los pacientes con PTI parecen depender de algún factor plasmático.

Un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio para identificar qué componente del plasma podía ser responsable de este efecto procoagulante, demostró que los pacientes con PTI presentaban un aumento de la resistencia a la PC y que no había diferencias en la concentración de factores de la coagulación y en el Fg plasmático en comparación con los controles sanos [272].

6.8 Proteínas relacionadas con la fibrinólisis

La hipofibrinólisis observada en los pacientes tratados con los AR-TPO podría deberse, al menos en parte, al aumento de los niveles plasmáticos de PAI-1 en estos pacientes ya que los niveles del resto de las proteínas implicadas en la fibrinólisis estudiadas (u-PA, t-PA y TAFI) fueron similares a los de los controles. Estos resultados coinciden con los reportados por el grupo de *Garabet et al (2017)* [369]. El PAI-1 se encuentra en las células endoteliales [390] y en las plaquetas. Las plaquetas se han identificado como un importante reservorio de PAI-1, llegando a representar algo más del 90% de PAI-1 circulante total [391]. Esto es así debido a que las plaquetas contienen PAI-1 ya sintetizado por los MKs, pero también tienen cantidades importantes de ARNm implicado en la síntesis *de novo* de PAI-1 en su conformación activa [392, 393]. Nuestros resultados también mostraron un mayor contenido intracelular de PAI-1 en las plaquetas de pacientes tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI) respecto al grupo no tratado (ST-PTI) y a controles sanos.

Como se han presentado en los resultados previos la posibilidad de que la TPO y sus agonistas pudiesen aumentar la expresión de PAI-1 en las plaquetas y MKs está respaldada por los resultados obtenidos en las células MEG-01 incubadas con TPO o con el romiplostim. En concordancia con nuestros resultados, un estudio previo demostró que la TPO aumentaba los niveles de PAI-1 en una línea celular de leucemia megacariocítica (UT-7) y en células de sangre de cordón humano diferenciadas con TPO de células CD34⁺ / CD41⁻ a células CD34⁺ / CD41⁺ [394].

El PAI-1 es considerado un marcador de daño e inflamación endotelial [395], por lo que su aumento en los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO podría indicar afectación endotelial en estos pacientes. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado una correlación entre los niveles plasmáticos del PAI-1 y de otro marcador de daño endotelial, la E-selectina. El daño endotelial en la PTI se ha relacionado con la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra los Ags de las plaquetas que puedan tener similitud con los Ags endoteliales [396, 397]. Otra posibilidad es que la mayor expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas de los pacientes tratados con los AR-TPO favorecería la interacción entre las plaquetas, los leucocitos y el endotelio vascular a través del ligando PSGL-1 [398], con la consecuente interacción entre los Acs antiplaquetarios con las plaquetas unidas al endotelio vascular.

6.9 Patrón de glicosilación plaquetario

Las GPs plaquetarias son elementos clave para la función de las mismas, no obstante, sus roles exactos y las estructuras de los glucanos que las componen no parecen estar claras del todo. En condiciones normales las plaquetas contienen ácido siálico en las cadenas laterales de los carbohidratos de sus GPs y está descrito que alteraciones en los glucanos de las mismas (y el grado de sialinización de éstos) puede afectar al aclaramiento de las plaquetas en el mecanismo fisiopatológico de la PTI. Por tanto, además del mecanismo tradicional de aclaramiento plaquetario dependiente de los receptores $Fc\gamma$ de macrófagos y otras células fagocíticas del sistema retículo endotelial, existe un mecanismo independiente de $Fc\gamma$ en donde algunos Acs anti-GPIIb-IX-V (pero no los Acs anti-GPIIb-IIIa) estimulaban la desialinización de las plaquetas al favorecer la secreción extracelular de sialidasas de los gránulos intraplaquetarios [399]. En consecuencia, tras la pérdida del ácido siálico habría una mayor exposición de galactosa terminal (β -galactosa) a los receptores hepáticos de Ashwell-Morell (una lectina de la familia tipo C que reconocen y unen asialoglucoproteínas), lo que llevaría a un aclaramiento de las plaquetas circulantes. Igualmente el enfriamiento de las plaquetas in vitro a 4 °C conduce además de a la pérdida del ácido siálico superficial, a la eliminación del residuo de β -galactosa unido a éste (Figura 42), exponiendo el residuo terminal de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que sería reconocido por el dominio de la lectina αM de la integrina $\alpha M\beta 2$ del macrófago hepático (células de Kupffer), dando como resultado el aclaramiento plaquetario [400-403].

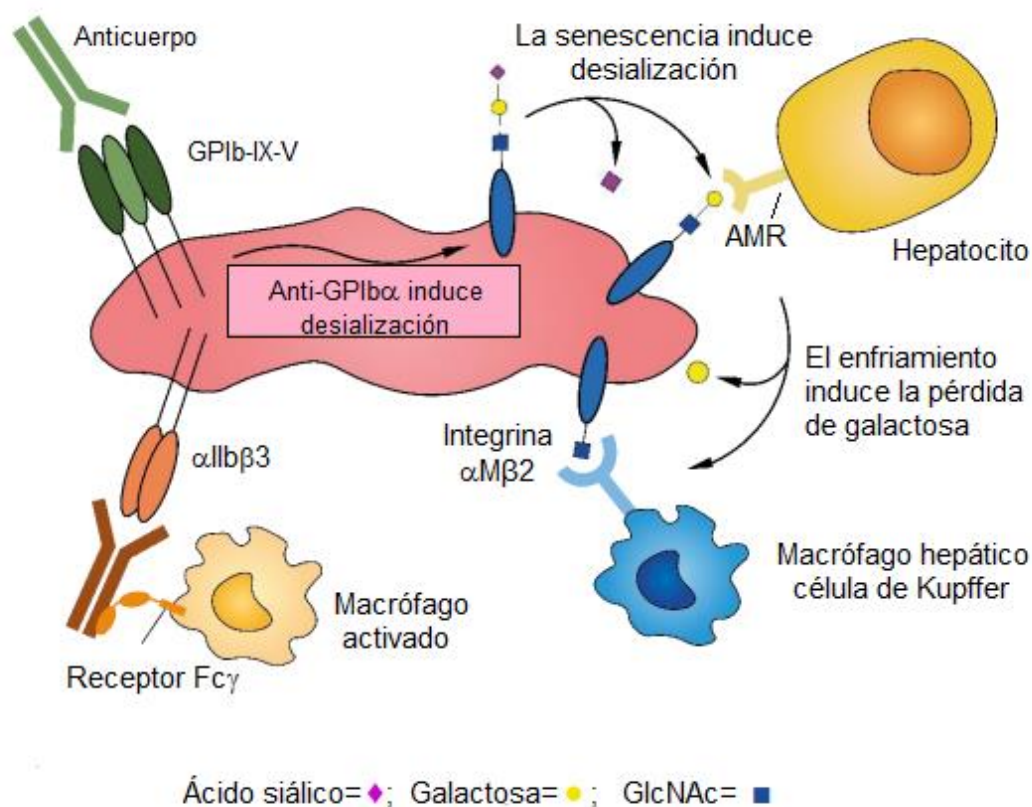


Figura 42. Alteraciones de los glucanos de las GPs de la superficie plaquetaria que lleva a la eliminación plaquetaria. (Extraído de “Glycomic characterisation of human platelets” Leow Ke Xuan. CID 01043607 Supervised by Professor Anne Dell and Dr Stuart Haslam).

Son varios los trabajos que describen que las GPs plaquetarias se unen a varias familias de lectinas, incluyendo la lectina tipo C (selectinas), tipo S (galectinas) y lectinas de tipo I. Este hecho permitiría la unión de las plaquetas a las células endoteliales durante la inflamación, aunque no se conoce el papel exacto de los glucanos en tales interacciones plaquetas-células endoteliales [404]. Más ampliamente ha sido estudiado el reconocimiento de los glucanos alterados de las GPs de la superficie de las plaquetas envejecidas mediante lectinas, lo que podría llevar al aclaramiento plaquetario (82). Por todo ello en nuestro trabajo se evaluó por CMF la unión de diferentes lectinas a los glucanos que componen las GPs de la superficie plaquetaria. Para ello se utilizó una lectina de aglutinina de germen de trigo (WGA), que se une al ácido siálico y a residuos de N-acetilglucosamina (β -d-GlcNAc) [405-407] y una lectina de leguminosa llamada *Erythrina cristagalli lectina* (ECA), específica

de la galactosa y de la N-acetilgalactosamina (Gal β 1-4 GlcNAc) que se usa como indicador de la pérdida de ácido siálico [408].

Además, un trabajo reciente de *Kauskot et al (2018)*, describió cómo una mutación en el gen que codifica para el transportador SLC35A1 de CMP-ácido siálico (citidina-5'-monofosfato ácido siálico) era responsable de la disminución de la vida media de las plaquetas de dos pacientes hermanos con una macrotrombocitopenia moderada. Esta mutación no interfería en la formación de proplaquetas debido a la elevada proporción de plaquetas inmaduras encontrada en la médula ósea de estos pacientes como posible mecanismo de compensación a la trombocitopenia periférica. Así, en dicho trabajo se detalla la importancia del transportador SLC35A1 responsable de transferir el CMP-ácido siálico al aparato de Golgi, donde es usado como sustrato para la sialinización de varias proteínas por acción de las sialiltransferasas. De este modo las GPs plaquetarias no tendrían ácido siálico y serían reconocidas por los AMR y serían retiradas de la circulación, disminuyendo la vida media de las plaquetas de estos pacientes [409].

Según los resultados obtenidos en nuestra cohorte de pacientes el patrón de glicosilación y sialinización evaluado mediante la unión de lectinas pareció diferir entre los pacientes con PTI y el grupo de controles sanos. Igualmente hubo diferencias entre los pacientes sin tratamiento (ST-PTI) y aquellos tratados con los AR-TPO (arTPO-PTI), lo que hace pensar que el patrón de glicosilación puede verse afectado también por el tratamiento empleado. Un trabajo presentado recientemente en el Congreso Americano de Hematología (ASH 2017) mostró que la TPO era capaz de inducir la expresión de glicosiltransferasas promoviendo la generación de las plaquetas (*Giannini S., et al. β -1,4-Galactosyltransferase 1 is a key regulator of thrombopoiesis. Blood. 2017; 130, Suppl 1, poster 1018.*). Este hecho abre la posibilidad de que los AR-TPO ejerzan el mismo efecto.

Tras el estudio de la unión de lectinas y utilizando un modelo *in vitro* de células HepG2 para demostrar la fagocitosis de las plaquetas a través de los receptores AMR [410] observamos una correlación positiva entre la unión de las lectinas WGA y ECA a las GPs de la membrana plaquetaria y su fagocitosis por el modelo celular propuesto. La pérdida de ácido siálico de las GPs de la membrana explicaría por qué las plaquetas de algunos pacientes con PTI son susceptibles de ser reconocidas por los receptores hepáticos AMR, induciendo su fagocitosis a nivel hepático. Esta observación podría llegar a servir como un importante biomarcador para predecir el grado de respuesta al inhibidor de la Neu, oseltamivir (Tamiflu®) en pacientes con PTI refractaria que no

responden a los tratamientos convencionales y que tienen aumentado la pérdida de ácido siálico [330]. Esta hipótesis se ve respaldada por los diferentes trabajos que demuestran cómo los inhibidores de las sialidasas pueden lograr restaurar el recuento y la función plaquetaria de estos pacientes [330, 411]. Además, los datos obtenidos están en concordancia con el aumento de los niveles de TPO circulante que sintetizaría el hígado como forma compensatoria a la eliminación plaquetaria de la circulación a través de los AMR [51].

6.10 Limitaciones del trabajo

- En nuestro estudio, la edad del grupo de pacientes tratados con los AR-TPO fue ligeramente superior que el de controles sanos. Este hecho podría interferir especialmente en los experimentos de glicosilación y apoptosis plaquetaria. Para verificar que la diferencia de edad media no sesgó nuestros resultados, se realizó un análisis estadístico adicional de los datos obtenidos en controles mayores y menores de 65 años de edad, no observándose diferencias entre los grupos.
- En el presente trabajo los pacientes estuvieron al menos dos meses de tratamiento con los AR-TPO antes de incluirse en el estudio. Para ver el efecto inductor de apoptosis plaquetaria y el efecto procoagulante que se ha descrito en este trabajo que tienen los AR-TPO, sería interesante realizar en un futuro un estudio longitudinal de una cohorte de pacientes desde el momento previo al inicio del tratamiento con los AR-TPO hasta al menos 3-6 meses de tratamiento con éstos para ver el efecto que tienen de forma tiempo-dependiente.
- Los pacientes incluidos tratados con los AR-TPO no fueron número suficiente para categorizar en dos grupos los pacientes tratados con eltrombopag y romiplostim. Debido al diferente mecanismo de acción de cada agonista, sería interesante incluir más pacientes para ver los efectos de cada fármaco en las variables objeto de estudio de esta propuesta.
- Este trabajo no detalla las características clínicas de los pacientes con PTI y sus manifestaciones hemorrágicas en relación con las variables de estudio.
- En esta propuesta se observó que la activación plaquetaria con ADP sólo estaba disminuida en el grupo de pacientes tratados con los AR-TPO y no en el grupo sin tratamiento. Para comprender este fenómeno serían necesarios trabajos

adicionales que tuvieran en cuenta los mecanismos intracelulares implicados en la funcionalidad plaquetaria de estos pacientes.

- Dado que en esta propuesta se observa un aumento de la expresión de la P-selectina plaquetaria en condiciones basales solo en el grupo tratado con los AR-TPO, podrían haberse realizado experimentos *in vitro* que demostraran la formación de agregados plaquetas-células blancas (en condiciones basales y tras la estimulación con diferentes agonistas) utilizando un doble marcaje CD41-PE para plaquetas y CD45-FITC para linfocitos, con el objetivo de demostrar que el aumento de P-selectina de las plaquetas se traduce en una mayor interacción con las células blancas a través del ligando PSGL-1 y por tanto en un mayor efecto procoagulante en la hemostasia global de estos pacientes. Igualmente podrían haberse analizado los niveles de P-selectina soluble en el plasma de pacientes de PTI previo y tras el tratamiento con los AR-TPO, así como su determinación en los diferentes grupos de estudio de este trabajo.
- En este trabajo no se analizan los anticuerpos antiplaquetarios debido a la falta de sensibilidad y especificidad de los test empleados para su detección y porque no se emplean en la práctica clínica habitual del centro para el diagnóstico de la PTI.
- Dado que se ha demostrado que el tipo de glicosilación de las proteínas plaquetarias puede condicionar la capacidad de activación de las plaquetas y su supervivencia [412], en esta propuesta se podrían haber incluido más lectinas además de la aglutinina de germen de trigo (WGA) y la lectina *Erythrina cristagalli* (ECA). En futuros estudios se preveen incluir las siguientes lectinas para caracterizar de forma más precisa la glicosilación de las plaquetas de distintos grupos de pacientes en función de su tratamiento y relacionarlo con la reactividad plaquetaria, como son: *Aleuria Aurantia* (α 1,6-Fucose), *Concanavalin A* (α -Manosa), *Datura Stramonium* (GlcNAc), *Dolichos Biflorus* (GalNAc α 1-3GalNAc), *Ricinus Communis Agglutinin* (β -Gal) y *Sambucus Nigra* (2,6-ácido siálico). Además, sería interesante seleccionar las muestras de los pacientes de PTI que muestren las mayores diferencias en la composición del glicocálix según los experimentos previos y analizarlas por MALDI-TOF-TOF MS/MS.

7. CONCLUSIONES

- El estudio de la cinética de la formación del coágulo de los pacientes de PTI tratados con los AR-TPO mostró un perfil procoagulante en estos pacientes que se puso de manifiesto con un aumento en la máxima fortaleza del coágulo y en una disminución de la fibrinólisis.
- Este efecto no parece estar relacionado con un aumento en la capacidad de activación de las plaquetas ya que, por el contrario, las plaquetas de todos los pacientes son hiporeactivas al estímulo con agonistas. No obstante, se observó un aumento en la expresión de P-selectina en condiciones basales en la superficie de las plaquetas de estos pacientes, lo podría favorecer la interacción entre plaquetas-células blancas y podría aumentar la fortaleza del coágulo.
- Las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO mostraron más signos de apoptosis que las de los pacientes que no recibían tratamiento. Estos signos incluían un aumento en la exposición de PS y en la actividad de las caspasas 3/7, 8 y 9.
- La sobreexposición de PS aumentó la superficie disponible para la unión del complejo protrombinasa (FXaVa). Este hecho podría constituir un mecanismo procoagulante compensatorio que podría reducir el riesgo de sangrado de los pacientes con PTI.
- Los experimentos realizados en células MEG-01 sugirieron que los AR-TPO podrían tener un efecto inductor de la actividad de las caspasas de las plaquetas.
- La apoptosis aumentada de las plaquetas de los pacientes con PTI tratados con los AR-TPO podría ser la responsable de generar más MPs y, consecuentemente, de la mayor capacidad de generar trombina asociada a MPs observada en estos pacientes.
- El tratamiento con los AR-TPO de los pacientes con PTI induce un aumento de los niveles plasmáticos y plaquetarios de PAI-I, lo que podría justificar el perfil hipofibrinolítico y procoagulante observado en estos pacientes.
- La glicosilación y las características de sialinización de las plaquetas de los pacientes con PTI puede ser clave para entender la fisiopatología de la enfermedad y las diferencias en las manifestaciones clínicas de los pacientes y el efecto que podrían tener las distintas alternativas terapéuticas disponibles.

- La evaluación global de la hemostasia y el estudio de los mecanismos procoagulantes compensatorios asociados al tratamiento con los AR-TPO deberían tenerse en cuenta a la hora de decidir la conveniencia y la pauta de tratamiento a recomendar en los pacientes con PTI y no basar la decisión exclusivamente en los recuentos plaquetarios.
- Es recomendable conocer la comorbilidad asociada al paciente con PTI y hacer una evaluación clínica cuidadosa para detectar a aquellos con estados protrombóticos (incluida la esplenectomía) que podrían tener consecuencias negativas para los pacientes con PTI. De esta forma podríamos brindar una medicina de precisión a estos pacientes y optimizar los tratamientos y sus costes.

8. REFERENCIAS

1. Packham, M.A., Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994. 72(3): p. 278-84.
2. Thomas, M.R. and R.F. Storey, The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*, 2015. 114(3): p. 449-58.
3. Nurden, A.T., Platelets and tissue remodeling: extending the role of the blood clotting system. *Endocrinology*, 2007. 148(7): p. 3053-5.
4. Semple, J.W. and J. Freedman, Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(4): p. 499-511.
5. Ali, R.A., L.M. Wuescher, and R.G. Worth, Platelets: essential components of the immune system. *Curr Trends Immunol*, 2015. 16: p. 65-78.
6. Kaushansky, K., et al., Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*, 1994. 369(6481): p. 568-71.
7. Avecilla, S.T., et al., Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 64-71.
8. Slayton, W.B., et al., Developmental differences in megakaryocyte maturation are determined by the microenvironment. *Stem Cells*, 2005. 23(9): p. 1400-8.
9. Sungaran, R., B. Markovic, and B.H. Chong, Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood*, 1997. 89(1): p. 101-7.
10. Kuter, D.J. and R.D. Rosenberg, The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood*, 1995. 85(10): p. 2720-30.
11. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): p. 3348-54.
12. White, M.J. and B.T. Kile, Apoptotic processes in megakaryocytes and platelets. *Semin Hematol*, 2010. 47(3): p. 227-34.
13. Mason, K.D., et al., Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, 2007. 128(6): p. 1173-86.
14. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(3): p. 231-41.
15. García, C.M.Á.S.A.y.V.V., Directrices de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI. Documento de Consenso. SEHH, 2011.
16. Sims, P.J. and T. Wiedmer, Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost*, 2001. 86(1): p. 266-75.
17. Bevers, E.M., et al., Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1439(3): p. 317-30.
18. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, 2002. 88(2): p. 186-93.
19. Sims, P.J., et al., Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem*, 1989. 264(29): p. 17049-57.
20. Morel, O., et al., Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*, 2004. 11(3): p. 156-64.
21. Freyssinet, J.M., Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*, 2003. 1(7): p. 1655-62.
22. Rijken, D.C. and H.R. Lijnen, New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*, 2009. 7(1): p. 4-13.
23. Valentina Gazzaniga, L.O., The discovery of platelets and their function. 2001. Vesalius, VII, 1, 22 - 26, 2001: p. 22-26.

24. Kuter, D.J., Milestones in understanding platelet production: a historical overview. *Br J Haematol*, 2014. 165(2): p. 248-58.
25. A, D., De l'origine des globules du sang, de leur mode de formation et de leur fin. 1842. *C R. Acad Sci* 14: 366-368.
26. A., B., Contributions to the physiology and pathology of the animal fluids. 1836. *London Medical Gazette* 8:50-133. .
27. O, H., Untersuchungen uber die Faserstoffgerinnung. . 1875. Uppsala, E. Berling. .
28. C.A., P., Pekelharing C.A. (1892), Untersuchungen uber das Fibrinferment. Amsterdam, J. Muller. , 1892.
29. M., A., Recherchessurla Coagulation du Sang. Theses, Paris, H. Jouve. , 1890.
30. P., M., Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebnisse der Physiologie* 1905. 4:307-422. .
31. Kaushansky, K., Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, 2008. 111(3): p. 981-6.
32. Li, C., et al., Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol*, 2012. 2012.
33. Kral, J.B., et al., Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus Med Hemother*, 2016. 43(2): p. 78-88.
34. Gawaz, M. and S. Vogel, Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*, 2013. 122(15): p. 2550-4.
35. Biología y Patología de las plaquetas. Scientific organizers: Dr. Eduardo Anguita y Dra. Laura Gutiérrez. Departamento de Hematología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid. January 2016
36. <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2015/muv151d.pdf>. Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. .
37. Ng, A.P. and W.S. Alexander, Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov*, 2017. 3: p. 17002-.
38. Thon, J.N. and J.E. Italiano, Platelet formation. *Semin Hematol*, 2010. 47(3): p. 220-6.
39. Deutsch, V.R. and A. Tomer, Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. *Br J Haematol*, 2013. 161(6): p. 778-93.
40. Woolthuis, C.M. and C.Y. Park, Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*, 2016. 127(10): p. 1242-8.
41. Weyrich, A.S. and G.A. Zimmerman, Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol*, 2013. 75: p. 569-91.
42. Lefrancais, E., et al., The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*, 2017. 544(7648): p. 105-109.
43. Hitchcock, I.S. and K. Kaushansky, Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol*, 2014. 165(2): p. 259-68.
44. Won, H.H., et al., Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach. *BMC Bioinformatics*, 2009. 10(Suppl 1): p. S53.
45. Kretz, A., et al., Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci*, 2005. 29(4): p. 569-79.
46. Varghese, L.N., et al., The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017. 8: p. 59.
47. Xu, M., et al., GPIIb/IIIa is required for platelet-mediated hepatic thrombopoietin generation. *Blood*, 2018. 132(6): p. 622-634.
48. <http://www.elsevier.es/es-revista-haematologica-49-articulo-apoptosis-mecanismos-celulares-e-implicaciones-13066671>

49. Grewal, P.K., The Ashwell-Morell receptor. *Methods Enzymol*, 2010. 479: p. 223-41.
50. Grozovsky, R., et al., Novel mechanisms of platelet clearance and thrombopoietin regulation. *Curr Opin Hematol*, 2015. 22(5): p. 445-51.
51. Grozovsky, R., et al., The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*, 2015. 21(1): p. 47-54.
52. Deng, Y., Y. Lin, and X. Wu, TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev*, 2002. 16(1): p. 33-45.
53. Verhagen, A.M., et al., Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000. 102(1): p. 43-53.
54. Grozovsky, R., et al., Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood*, 2015. 126(16): p. 1877-84.
55. Youle, R.J. and A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(1): p. 47-59.
56. Adams, J.M. and S. Cory, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, 2001. 26(1): p. 61-6.
57. Kile, B.T., The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost*, 2009. 7 Suppl 1: p. 214-7.
58. Deveraux, Q.L., et al., IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, 1998. 17(8): p. 2215-23.
59. Tamm, I., et al., IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 1998. 58(23): p. 5315-20.
60. Kitazumi, I. and M. Tsukahara, Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *FEBS J*, 2011. 278(3): p. 427-41.
61. Nayak, M.K., P.P. Kulkarni, and D. Dash, Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span. *J Biol Chem*, 2013. 288(10): p. 6826-34.
62. Smalle, J. and R.D. Vierstra, The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004. 55: p. 555-90.
63. Ferrell, K., et al., Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci*, 2000. 25(2): p. 83-8.
64. Kourtis, N. and N. Tavernarakis, Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *EMBO J*, 2011. 30(13): p. 2520-31.
65. Nayak, M.K., K. Kumar, and D. Dash, Regulation of proteasome activity in activated human platelets. *Cell Calcium*, 2011. 49(4): p. 226-32.
66. Gupta, N., et al., Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(1): p. 160-8.
67. Hoyer, F.F., G. Nickenig, and N. Werner, Microparticles--messengers of biological information. *J Cell Mol Med*, 2010. 14(9): p. 2250-6.
68. Burnier, L., et al., Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*, 2009. 101(3): p. 439-51.
69. Zhao, L., et al., Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. 35: p. 54.
70. White, J.G. and G. Escolar, Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets*, 1993. 4(4): p. 175-89.
71. Jurk, K. and B.E. Kehrel, Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*, 2005. 31(4): p. 381-92.
72. White, J.G., Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood*, 1968. 31(5): p. 604-22.
73. Behnke, O., The morphology of blood platelet membrane systems. *Ser Haematol*, 1970. 3(4): p. 3-16.

74. Podoplelova, N.A., et al., Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*, 2016. 128(13): p. 1745-55.
75. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*, 2014. 2014: p. 781857.
76. Fogelson, A.L. and K.B. Neeves, Fluid Mechanics of Blood Clot Formation. *Annu Rev Fluid Mech*, 2015. 47: p. 377-403.
77. Escolar, G. and J.G. White, The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells*, 1991. 17(3): p. 467-85; discussion 486-95.
78. Selvadurai, M.V. and J.R. Hamilton, Structure and function of the open canalicular system - the platelet's specialized internal membrane network. *Platelets*, 2018. 29(4): p. 319-325.
79. Rivera, J., et al., Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*, 2009. 94(5): p. 700-11.
80. Hartwig, J.H. and M. DeSisto, The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol*, 1991. 112(3): p. 407-25.
81. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics. Edited by Pablo Gressle, Clive Page, Valentin Fuster and Jos Vermeylen. Cambridge University Press, 2002. .
82. Macaya, A.L.F.y.C., Antiagregación plaquetaria. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España. . *Rev Esp Cardiol Supl.*, 2013. 13(B):2-7
83. Floyd, C.N. and A. Ferro, The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary. *JRSM Cardiovasc Dis*, 2012. 1(2).
84. Wagner, C.L., et al., Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, 1996. 88(3): p. 907-14.
85. Wencel-Drake, J.D., et al., Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol*, 1986. 124(2): p. 324-34.
86. Duperray, A., et al., Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol*, 1987. 104(6): p. 1665-73.
87. Marguerie, G.A., E.F. Plow, and T.S. Edgington, Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem*, 1979. 254(12): p. 5357-63.
88. Angiolillo, D.J., D. Capodanno, and S. Goto, Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J*, 2010. 31(1): p. 17-28.
89. Kahn, M.L., et al., A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 1998. 394(6694): p. 690-4.
90. Maxwell, K.F., et al., Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat Struct Biol*, 1999. 6(5): p. 437-42.
91. Ierino, F.L., et al., Mapping epitopes of human Fc gamma RII (CDw32) with monoclonal antibodies and recombinant receptors. *J Immunol*, 1993. 150(5): p. 1794-803.
92. Hibbs, M.L., et al., Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(7): p. 2240-4.
93. Qiao, J., et al., The platelet Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Immunol Rev*, 2015. 268(1): p. 241-52.
94. Cox, D., S.W. Kerrigan, and S.P. Watson, Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost*, 2011. 9(6): p. 1097-107.

95. Arman, M., et al., Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by FcγRIIA, integrin αIIbβ3, and platelet factor 4. *Blood*, 2014. 123(20): p. 3166-74.
96. Kerrigan, S.W. and D. Cox, Platelet-bacterial interactions. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(4): p. 513-23.
97. Arman, M. and K. Krauel, Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2015. 13(6): p. 893-908.
98. McNicol, A., Bacteria-induced intracellular signalling in platelets. *Platelets*, 2015. 26(4): p. 309-16.
99. Murphy, S. and F.H. Gardner, Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability--deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 1969. 280(20): p. 1094-8.
100. Filip, D.J. and R.H. Aster, Relative hemostatic effectiveness of human platelets stored at 4 degrees and 22 degrees C. *J Lab Clin Med*, 1978. 91(4): p. 618-24.
101. Holmsen, H., K.L. Kaplan, and C.A. Dangelmaier, Differential energy requirements for platelet responses. A simultaneous study of aggregation, three secretory processes, arachidonate liberation, phosphatidylinositol breakdown and phosphatidate production. *Biochem J*, 1982. 208(1): p. 9-18.
102. Leger, A.J., et al., Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation*, 2006. 113(9): p. 1244-54.
103. Kato, Y., et al., Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur J Pharmacol*, 2003. 473(2-3): p. 163-9.
104. Flaumenhaft, R., Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(7): p. 1152-60.
105. Blair, P. and R. Flaumenhaft, Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 2009. 23(4): p. 177-89.
106. Folkman, J., T. Browder, and J. Palmblad, Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost*, 2001. 86(1): p. 23-33.
107. Coller, B.S., et al., Platelet fibrinogen and vitronectin in Glanzmann thrombasthenia: evidence consistent with specific roles for glycoprotein IIb/IIIa and αvβ3 integrins in platelet protein trafficking. *Blood*, 1991. 78(10): p. 2603-10.
108. E, M., Human platelet morphology/ultrastructure. In von Bruchhausen F, Walter U (Eds). *Handbook of experimental pharmacology. Platelets and their factors*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 1997. vol 126: p. 28-60.
109. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 2001. 12(5): p. 261-73.
110. Israels, S.J., et al., Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood*, 1992. 80(1): p. 143-52.
111. Shirakawa, R., et al., Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem*, 2004. 279(11): p. 10730-7.
112. Tolmachova, T., et al., Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(14): p. 5872-7.
113. Heijnen, H. and P. van der Sluijs, Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost*, 2015. 13(12): p. 2141-51.
114. Nickel, W. and C. Rabouille, Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(2): p. 148-55.
115. Feng, W., et al., Dissection of autophagy in human platelets. *Autophagy*, 2014. 10(4): p. 642-51.
116. Thon, J.N., et al., T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol*, 2012. 198(4): p. 561-74.

117. Chen, K., T.C. Detwiler, and D.W. Essex, Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Br J Haematol*, 1995. 90(2): p. 425-31.
118. Essex, D.W., K. Chen, and M. Swiatkowska, Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*, 1995. 86(6): p. 2168-73.
119. Cho, J., et al., A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest*, 2008. 118(3): p. 1123-31.
120. Gale, A.J., Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol*, 2011. 39(1): p. 273-80.
121. Andrews, R.K., et al., Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life*, 2004. 56(1): p. 13-8.
122. Yun, S.H., et al., Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*, 2016. 2016: p. 9060143.
123. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2013;13(B):2-7 - Vol. 13 Núm.Supl.B DOI: 10.1016/S1131-3587(13)70073-6.
124. Lesurtel, M., et al., Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, 2006. 312(5770): p. 104-7.
125. Hardy, A.R., et al., Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood*, 2004. 104(6): p. 1745-52.
126. Choi, W.S., O.H. Jeon, and D.S. Kim, CD40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin alpha(IIb)beta(3). *J Thromb Haemost*, 2010. 8(6): p. 1364-71.
127. Menchen, L., et al., Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn's disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand. *Gut*, 2009. 58(7): p. 920-8.
128. Fernandez Bello, I., et al., Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients. *Thromb Haemost*, 2012. 107(1): p. 88-98.
129. Siljander, P.R., et al., Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood*, 2004. 103(4): p. 1333-41.
130. Banchereau, J., et al., The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 881-922.
131. Clark, E.A. and J.A. Ledbetter, How B and T cells talk to each other. *Nature*, 1994. 367(6462): p. 425-8.
132. Foy, T.M., et al., Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14: p. 591-617.
133. Hollenbaugh, D., et al., The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J*, 1992. 11(12): p. 4313-21.
134. Henn, V., et al., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998. 391(6667): p. 591-4.
135. Henn, V., et al., The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, 2001. 98(4): p. 1047-54.
136. Inwald, D.P., et al., CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*, 2003. 92(9): p. 1041-8.
137. Slupsky, J.R., et al., Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost*, 1998. 80(6): p. 1008-14.
138. Chakrabarti, S., et al., CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(11): p. 2428-34.
139. Andre, P., et al., CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med*, 2002. 8(3): p. 247-52.

140. Urbich, C., et al., CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*, 2002. 106(8): p. 981-6.
141. Semeraro, N., et al., Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites. *Immunology*, 1983. 50(4): p. 529-35.
142. Bevilacqua, M.P., et al., Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med*, 1984. 160(2): p. 618-23.
143. Giesen, P.L., et al., Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2311-5.
144. Falati, S., et al., Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*, 2003. 197(11): p. 1585-98.
145. Furie, B. and B.C. Furie, Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*, 1992. 326(12): p. 800-6.
146. Revak, S.D., C.G. Cochrane, and J.H. Griffin, The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. A comparison of normal plasma with plasmas deficient in factor XI, prekallikrein, or high molecular weight kininogen. *J Clin Invest*, 1977. 59(6): p. 1167-75.
147. Pixley, R.A., et al., A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation. *J Biol Chem*, 1987. 262(21): p. 10140-5.
148. Fair, B.D., et al., Detection by fluorescence of structural changes accompanying the activation of Hageman factor (factor XII). *Proc Soc Exp Biol Med*, 1977. 155(2): p. 199-202.
149. Vroman, L., EFFECTS OF HYDROPHOBIC SURFACES UPON BLOOD COAGULATION. *Thromb Diath Haemorrh*, 1964. 10: p. 455-93.
150. Silverberg, M. and A.P. Kaplan, Enzymatic activities of activated and zymogen forms of human Hageman factor (factor XII). *Blood*, 1982. 60(1): p. 64-70.
151. Griffin, J.H., Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(4): p. 1998-2002.
152. Zhuo, R. and E.A. Vogler, Practical application of a chromogenic FXIIa assay. *Biomaterials*, 2006. 27(28): p. 4840-5.
153. Silverberg, M., et al., Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate. *J Biol Chem*, 1980. 255(15): p. 7281-6.
154. Rawala-Sheikh, R., et al., Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry*, 1990. 29(10): p. 2606-11.
155. Osterud, B., B.N. Bouma, and J.H. Griffin, Human blood coagulation factor IX. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI. *J Biol Chem*, 1978. 253(17): p. 5946-51.
156. Whelihan, M.F., et al., Coagulation procofactor activation by factor XIa. *J Thromb Haemost*, 2010. 8(7): p. 1532-9.
157. Weisel, J.W. and R.I. Litvinov, Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 2013. 121(10): p. 1712-9.
158. Muszbek, L., et al., Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev*, 2011. 91(3): p. 931-72.
159. Mosesson, M.W., Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(8): p. 1894-904.
160. Chapin, J.C. and K.A. Hajjar, Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*, 2015. 29(1): p. 17-24.
161. Booth, N.A., Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 1999. 12(3): p. 423-33.

162. Flemmig, M. and M.F. Melzig, Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis. *J Pharm Pharmacol*, 2012. 64(8): p. 1025-39.
163. Mori, K., et al., The activation of type 1 and type 2 plasminogen by type I and type II tissue plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1995. 270(7): p. 3261-7.
164. Mondino, A. and F. Blasi, uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol*, 2004. 25(8): p. 450-5.
165. Lijnen, H.R., Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)*, 2002. 67(1): p. 92-8.
166. Abdul, S., et al., Natural heterogeneity of alpha2-antiplasmin: functional and clinical consequences. *Blood*, 2016. 127(5): p. 538-45.
167. Christensen, U. and L. Sottrup-Jensen, Mechanism of alpha 2-macroglobulin-proteinase interactions. Studies with trypsin and plasmin. *Biochemistry*, 1984. 23(26): p. 6619-26.
168. Booth, N.A., et al., Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol*, 1988. 70(3): p. 327-33.
169. Zhu, Y., P. Carmeliet, and W.P. Fay, Plasminogen activator inhibitor-1 is a major determinant of arterial thrombolysis resistance. *Circulation*, 1999. 99(23): p. 3050-5.
170. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): p. 3378-84.
171. Broze, G.J. and T.J. Girard, TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR: STRUCTURE-FUNCTION. *Front Biosci*. 17: p. 262-80.
172. Bouma, B.N. and L.O. Mosnier, Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med*, 2006. 38(6): p. 378-88.
173. Olson, S.T., et al., Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. a paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie*, 2010. 92(11): p. 1587-96.
174. Esmon, C.T., Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1477(1-2): p. 349-60.
175. <https://www.rotam.de/en/methodology/thromboelastometry/>
176. <https://www.rotam.de/en/methodology/result-interpretation-rotam-delta-und-sigma/>
177. Ninivaggi, M., et al., Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem*, 2012. 58(8): p. 1252-9.
178. <http://www.thrombinoscope.com/thrombin-generation/>
179. Riley P. Thrombin generation assay aids development: Calibrated Automated Thrombogram System for global hemostasis measurements. *Genet. Eng. Biotechnol. J*. 2012. 32 (9): 52. .
180. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/thrombocytopenia>.
181. Mhawech, P. and A. Saleem, Inherited giant platelet disorders. Classification and literature review. *Am J Clin Pathol*, 2000. 113(2): p. 176-90.
182. Cuker, A. and D.B. Cines, Immune thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010. 2010: p. 377-84.
183. Stasi, R., Immune thrombocytopenia: pathophysiologic and clinical update. *Semin Thromb Hemost*, 2012. 38(5): p. 454-62.
184. Rodeghiero, F., et al., Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, 2009. 113(11): p. 2386-93.
185. Harrington, W.J., et al., Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med*, 1951. 38(1): p. 1-10.

186. Shulman, N.R., V.J. Marder, and R.S. Weinrach, Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann N Y Acad Sci*, 1965. 124(2): p. 499-542.
187. Olsson, B., et al., T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med*, 2003. 9(9): p. 1123-4.
188. Khodadi, E., et al., Bone marrow niche in immune thrombocytopenia: a focus on megakaryopoiesis. *Ann Hematol*, 2016. 95(11): p. 1765-76.
189. Dameshek, W. and E.B. Miller, The megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura, a form of hypersplenism. *Blood*, 1946. 1: p. 27-50.
190. Zhang, W., et al., Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood*, 2009. 113(17): p. 4086-93.
191. Wright, J.F., et al., Characterization of platelet-reactive antibodies in children with varicella-associated acute immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Br J Haematol*, 1996. 95(1): p. 145-52.
192. Takahashi, T., et al., Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2004. 124(1): p. 91-6.
193. Li, Z., M.A. Nardi, and S. Karpatkin, Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *Blood*, 2005. 106(2): p. 572-6.
194. Ji, X., et al., T cell immune abnormalities in immune thrombocytopenia. *J Hematol Oncol*, 2014. 7: p. 72.
195. He, R., et al., Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1994. 83(4): p. 1024-32.
196. Boylan, B., et al., Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood*, 2004. 104(5): p. 1350-5.
197. Karpatkin, S. and G.W. Siskind, In vitro detection of platelet antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. *Blood*, 1969. 33(6): p. 795-812.
198. Karpatkin, S., et al., Cumulative experience in the detection of antiplatelet antibody in 234 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, systemic lupus erythematosus and other clinical disorders. *Am J Med*, 1972. 52(6): p. 776-85.
199. Saleh, M.N., et al., Monocyte-platelet interaction in immune and nonimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1989. 74(4): p. 1328-31.
200. Chow, L., et al., A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8+ T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy. *Blood*, 2010. 115(6): p. 1247-53.
201. Chang, M., et al., Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, 2003. 102(3): p. 887-95.
202. McMillan, R., et al., Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood*, 2004. 103(4): p. 1364-9.
203. Scheduling, S., et al., Human plasma thrombopoietin levels are regulated by binding to platelet thrombopoietin receptors in vivo. *Transfusion*, 2002. 42(3): p. 321-7.
204. Kuter, D.J. and T.B. Gernsheimer, Thrombopoietin and Platelet Production in Chronic Immune Thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009. 23(6): p. 1193-211.

205. Fujisawa, K., et al., Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet glycoprotein IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1991. 77(10): p. 2207-13.
206. Kuwana, M., J. Kaburaki, and Y. Ikeda, Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest*, 1998. 102(7): p. 1393-402.
207. Zufferey, A., R. Kapur, and J.W. Semple, Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). *J Clin Med*, 2017. 6(2).
208. Cines, D.B., A. Cuker, and J.W. Semple, Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Presse Med*, 2014. 43(4 Pt 2): p. e49-59.
209. Zhang, H.Y., et al., [The diagnostic value of platelet glycoprotein-specific autoantibody detection in idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2004. 12(2): p. 204-6.
210. Nieswandt, B., et al., Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood*, 2000. 96(7): p. 2520-7.
211. Webster, M.L., et al., Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIbIIIa versus GPIIbIIIa antibodies. *Blood*, 2006. 108(3): p. 943-6.
212. Leytin, V., et al., Intravenous immunoglobulin inhibits anti-glycoprotein IIb-induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2006. 133(1): p. 78-82.
213. Deng, G., et al., Investigation of platelet apoptosis in adult patients with chronic immune thrombocytopenia. *Hematology*, 2017. 22(3): p. 155-161.
214. Urbanus, R.T., et al., Patient autoantibodies induce platelet destruction signals via raft-associated glycoprotein Iba and Fc RIIa in immune thrombocytopenia. *Haematologica*, 2013. 98(7): p. e70-2.
215. Emmerich, F., et al., High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2007. 136(2): p. 309-14.
216. Yu, H., et al., TLR7 regulates dendritic cell-dependent B-cell responses through BlyS in immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2011. 86(1): p. 67-74.
217. Yang, Q., et al., TLR7 promotes Th1 polarization in immune thrombocytopenia. *Thromb Res*, 2011. 128(3): p. 237-42.
218. Audia, S., et al., Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun Rev*, 2017. 16(6): p. 620-632.
219. Johnsen, J., Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. 2012: p. 306-12.
220. Wang, T., et al., Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 2005. 90(7): p. 914-23.
221. Hu, Y., et al., Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *PLoS One*, 2011. 6(10): p. e26522.
222. Panitsas, F.P., et al., Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood*, 2004. 103(7): p. 2645-7.
223. Semple, J.W., et al., Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood*, 1996. 87(10): p. 4245-54.
224. Ogawara, H., et al., High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2003. 71(4): p. 283-8.
225. Audia, S., et al., Preferential splenic CD8(+) T-cell activation in rituximab-nonresponder patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, 2013. 122(14): p. 2477-86.

226. Zhang, J., et al., Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 2009. 94(9): p. 1326-9.
227. Cao, J., et al., Elevated plasma IL-22 levels correlated with Th1 and Th22 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Clin Immunol*, 2011. 141(1): p. 121-3.
228. Hu, Y., et al., Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol*, 2012. 73(6): p. 629-35.
229. Audia, S., et al., Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. *Blood*, 2014. 124(18): p. 2858-66.
230. Zhu, X., et al., Elevated interleukin-21 correlated to Th17 and Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia. *J Clin Immunol*, 2010. 30(2): p. 253-9.
231. Zhao, C., et al., Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. *Haematologica*, 2008. 93(9): p. 1428-30.
232. Zhang, F., et al., Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2006. 76(5): p. 427-31.
233. Li, S., et al., CD8+ T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2007. 139(4): p. 605-11.
234. Olsson, B., et al., Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood*, 2008. 112(4): p. 1078-84.
235. Olsson, B., M. Jernas, and H. Wadenvik, Increased plasma levels of granzymes in adult patients with chronic immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 2012. 107(6): p. 1182-4.
236. Ling, Y., et al., Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol*, 2007. 79(4): p. 310-6.
237. Liu, B., et al., Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2007. 78(2): p. 139-43.
238. Sakakura, M., et al., Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res*, 2007. 120(2): p. 187-93.
239. Stasi, R., et al., Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood*, 2008. 112(4): p. 1147-50.
240. Miyara, M. and S. Sakaguchi, Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, 2007. 13(3): p. 108-16.
241. Li, F., et al., Insufficient secretion of IL-10 by Tregs compromised its control on over-activated CD4+ T effector cells in newly diagnosed adult immune thrombocytopenia patients. *Immunol Res*, 2015. 61(3): p. 269-80.
242. Sun, T., et al., Interleukin 35 may contribute to the loss of immunological self-tolerance in patients with primary immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2015. 169(2): p. 278-85.
243. Audia, S., et al., Immunologic effects of rituximab on the human spleen in immune thrombocytopenia. *Blood*, 2011. 118(16): p. 4394-400.
244. Bao, W., et al., Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood*, 2010. 116(22): p. 4639-45.
245. Yu, J., et al., Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2008. 112(4): p. 1325-8.
246. Yazdanbakhsh, K., H. Zhong, and W. Bao, Immune Dysregulation in Immune Thrombocytopenia (ITP). *Semin Hematol*, 2013. 50(0 1): p. S63-7.
247. Olsson, B., et al., Increased number of B-cells in the red pulp of the spleen in ITP. *Ann Hematol*, 2012. 91(2): p. 271-7.

248. Daridon, C., et al., Splenic proliferative lymphoid nodules distinct from germinal centers are sites of autoantigen stimulation in immune thrombocytopenia. *Blood*, 2012. 120(25): p. 5021-31.
249. Li, X., et al., Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, 2012. 120(16): p. 3318-25.
250. Nishimoto, T. and M. Kuwana, CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the pathophysiology of immune thrombocytopenia. *Semin Hematol*, 2013. 50 Suppl 1: p. S43-9.
251. Mauri, C. and A. Bosma, Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 221-41.
252. Aslam, R., et al., Splenic lymphocyte subtypes in immune thrombocytopenia: increased presence of a subtype of B-regulatory cells. *Br J Haematol*, 2016. 173(1): p. 159-60.
253. Peerschke, E.I., et al., Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2010. 148(4): p. 638-45.
254. Najaoui, A., et al., Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol*, 2012. 88(2): p. 167-74.
255. Kuwana, M., Y. Okazaki, and Y. Ikeda, Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 2009. 7(2): p. 322-9.
256. Catani, L., et al., Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol*, 2006. 34(7): p. 879-87.
257. Saito, A., et al., Circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with primary and *Helicobacter pylori*-associated immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*, 2012. 88(4): p. 340-9.
258. Zhong, H., et al., CD16+ monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia. *Blood*, 2012. 120(16): p. 3326-35.
259. Yang, Y., et al., Abnormal Distribution and Function of Monocyte Subsets in Patients With Primary Immune Thrombocytopenia. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017. 23(7): p. 786-792.
260. Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Immune Thrombocytopenia (ITP). Presented by the American Society of Hematology, adapted from: The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. . 2011.
261. Provan, D., et al., International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 2010. 115(2): p. 168-86.
262. Cines, D.B., et al., The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, 2009. 113(26): p. 6511-21.
263. Fogarty, P.F., et al., Selective validation of the WHO Bleeding Scale in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Curr Med Res Opin*, 2012. 28(1): p. 79-87.
264. Rodeghiero, F., et al., Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood*, 2013. 121(14): p. 2596-606.
265. Directrices de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la PTI: Documento de Consenso. SEHH. © 2011 Prodrug Multimedia, S. L. ISBN: 978-84-95972-63-7.
266. Sanz, M.A., et al., [Guidelines for diagnosis, treatment and monitoring of primary immune thrombocytopenia]. *Med Clin (Barc)*, 2012. 138(6): p. 261 e1-261 e17.

267. Gil, W.R., Diagnosis and treatment of Immune thrombocytopenic purpura. *Rev Med Hered.*, 2015. 26:246-255.
268. McMillan, R., et al., Self-reported health-related quality of life in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 2008. 83(2): p. 150-4.
269. Mathias, S.D., et al., A disease-specific measure of health-related quality of life for use in adults with immune thrombocytopenic purpura: its development and validation. *Health Qual Life Outcomes*, 2007. 5: p. 11.
270. Hill, Q.A. and A.C. Newland, Fatigue in immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2015. 170(2): p. 141-9.
271. Cortelazzo, S., et al., High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1991. 77(1): p. 31-3.
272. Alvarez-Roman, M.T., et al., Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2016. 175(5): p. 925-934.
273. Alvarez Roman, M.T., et al., Effect of thrombopoietin-receptor agonists on a proliferation-inducing ligand (APRIL) plasma levels in patients with immune thrombocytopaenia. *Br J Clin Pharmacol*, 2014. 78(3): p. 674-6.
274. Rodeghiero, F., Is ITP a thrombophilic disorder? *Am J Hematol*, 2016. 91(1): p. 39-45.
275. Cohen, Y.C., et al., The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med*, 2000. 160(11): p. 1630-8.
276. Portielje, J.E., et al., Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2001. 97(9): p. 2549-54.
277. Li, Z., et al., Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia. *Int J Hematol*, 2011. 93(1): p. 91-8.
278. Li, J., et al., Effects of rapamycin combined with low dose prednisone in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Clin Dev Immunol*, 2013. 2013: p. 548085.
279. Cines, D.B. and J.B. Bussel, How I treat idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Blood*, 2005. 106(7): p. 2244-51.
280. Mazzucconi, M.G., et al., Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience. *Blood*, 2007. 109(4): p. 1401-7.
281. Praituan, W. and P. Rojnuckarin, Faster platelet recovery by high-dose dexamethasone compared with standard-dose prednisolone in adult immune thrombocytopenia: a prospective randomized trial. *J Thromb Haemost*, 2009. 7(6): p. 1036-8.
282. Wei, Y., et al., High-dose dexamethasone vs prednisone for treatment of adult immune thrombocytopenia: a prospective multicenter randomized trial. *Blood*, 2016. 127(3): p. 296-302; quiz 370.
283. Basta, M., et al., High-dose intravenous immunoglobulin modifies complement-mediated in vivo clearance. *Blood*, 1989. 74(1): p. 326-33.
284. Basta, M. and M.C. Dalakas, High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest*, 1994. 94(5): p. 1729-35.
285. Durandy, A., et al., Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clin Exp Immunol*, 2009. 158 Suppl 1: p. 2-13.
286. MacMillan, H.F., T. Lee, and A.C. Issekutz, Intravenous immunoglobulin G-mediated inhibition of T-cell proliferation reflects an endogenous mechanism by which IgG modulates T-cell activation. *Clin Immunol*, 2009. 132(2): p. 222-33.
287. Ballow, M., The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune

- and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. 127(2): p. 315-23; quiz 324-5.
288. De Groot, A.S., et al., Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes". *Blood*, 2008. 112(8): p. 3303-11.
289. Siedlar, M., et al., Preparations of intravenous immunoglobulins diminish the number and proinflammatory response of CD14+CD16++ monocytes in common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Immunol*, 2011. 139(2): p. 122-32.
290. Zhao, C., et al., Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J Proteome Res*, 2009. 8(8): p. 4028-38.
291. Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, and J.V. Ravetch, Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 2006. 313(5787): p. 670-3.
292. Vani, J., et al., Role of natural antibodies in immune homeostasis: IVIg perspective. *Autoimmun Rev*, 2008. 7(6): p. 440-4.
293. Viard, I., et al., Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science*, 1998. 282(5388): p. 490-3.
294. Prasad, N.K., et al., Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol*, 1998. 161(7): p. 3781-90.
295. Crow, A.R., et al., A role for IL-1 receptor antagonist or other cytokines in the acute therapeutic effects of IVIg? *Blood*, 2007. 109(1): p. 155-8.
296. Altnauer, F., et al., Concurrent presence of agonistic and antagonistic anti-CD95 autoantibodies in intravenous Ig preparations. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(6): p. 1185-90.
297. Paquin Proulx, D., et al., Inhibition of B cell-mediated antigen presentation by intravenous immunoglobulins (IVIg). *Clin Immunol*, 2010. 135(3): p. 422-9.
298. Samuelsson, A., T.L. Towers, and J.V. Ravetch, Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science*, 2001. 291(5503): p. 484-6.
299. Ott, V.L., D.C. Fong, and J.C. Cambier, Fc gamma RIIB as a potential molecular target for intravenous gamma globulin therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. 108(4 Suppl): p. S95-8.
300. Crow, A.R., et al., IVIg-mediated amelioration of murine ITP via FcgammaRIIB is independent of SHIP1, SHP-1, and Btk activity. *Blood*, 2003. 102(2): p. 558-60.
301. Palandri, F., et al., Have splenectomy rate and main outcomes of ITP changed after the introduction of new treatments? A monocentric study in the outpatient setting during 35 years. *Am J Hematol*, 2016. 91(4): p. E267-72.
302. Anguita, E., et al., Splenectomy in ITP: we keep removing a healthy functional organ. *Ann Hematol*, 2016. 95(11): p. 1911-2.
303. Delaitre, B., et al., [Laparoscopic splenectomy for hematologic diseases. Study of 275 cases. French Society of Laparoscopic Surgery]. *Ann Chir*, 2000. 125(6): p. 522-9.
304. Boyle, S., et al., Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, 2013. 121(23): p. 4782-90.
305. Langeberg, W.J., et al., Thromboembolism in patients with immune thrombocytopenia (ITP): a meta-analysis of observational studies. *Int J Hematol*, 2016. 103(6): p. 655-64.
306. Kojouri, K., et al., Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet

- count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood*, 2004. 104(9): p. 2623-34.
307. Vianelli, N., et al., Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases. *Haematologica*, 2005. 90(1): p. 72-7.
 308. Habermalz, B., et al., Laparoscopic splenectomy: the clinical practice guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). *Surg Endosc*, 2008. 22(4): p. 821-48.
 309. Thomsen, R.W., et al., Risk for hospital contact with infection in patients with splenectomy: a population-based cohort study. *Ann Intern Med*, 2009. 151(8): p. 546-55.
 310. Kuter, D.J., The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *Int J Hematol*, 2013. 98(1): p. 10-23.
 311. Qu, M.M., et al., Cytokine changes in response to TPO receptor agonist treatment in primary immune thrombocytopenia. *Cytokine*, 2017. 92: p. 110-117.
 312. Bussel, J.B., et al., Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. *Blood*, 2009. 113(10): p. 2161-71.
 313. Kuter, D.J., et al., Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 2010. 363(20): p. 1889-99.
 314. http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000942/WC5000.
 315. Kuter, D.J., et al., Long-term treatment with romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenia: safety and efficacy. *Br J Haematol*, 2013. 161(3): p. 411-23.
 316. Vishnu, P. and D.M. Aboulafia, Long-term safety and efficacy of romiplostim for treatment of immune thrombocytopenia. *J Blood Med*, 2016. 7: p. 99-106.
 317. Bussel, J.B., et al., Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2009. 373(9664): p. 641-8.
 318. http://www.emea.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/001110/WC500089964.pdf.
 319. Allred, A.J., et al., Eltrombopag increases plasma rosuvastatin exposure in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 2011. 72(2): p. 321-9.
 320. Khellaf, M., et al., A retrospective pilot evaluation of switching thrombopoietic receptor-agonists in immune thrombocytopenia. *Haematologica*, 2013. 98(6): p. 881-7.
 321. Gonzalez-Porras, J.R., et al., Use of eltrombopag after romiplostim in primary immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2015. 169(1): p. 111-6.
 322. Bussel, J.B., et al., Case study of remission in adults with immune thrombocytopenia following cessation of treatment with the thrombopoietin mimetic romiplostim. *Hematology*, 2016. 21(4): p. 257-62.
 323. Mahevas, M., et al., The temporary use of thrombopoietin-receptor agonists may induce a prolonged remission in adult chronic immune thrombocytopenia. Results of a French observational study. *Br J Haematol*, 2014. 165(6): p. 865-9.
 324. Gonzalez-Lopez, T.J., et al., Sustained response after discontinuation of short- and medium-term treatment with eltrombopag in patients with immune thrombocytopenia. *Platelets*, 2015. 26(1): p. 83-6.
 325. Al-Samkari, H. and D.J. Kuter, Thrombopoietin Level Predicts Response to Treatment with Eltrombopag and Romiplostim in Immune Thrombocytopenia. *Am J Hematol*, 2018.

326. Arnold, D.M., et al., Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med*, 2007. 146(1): p. 25-33.
327. Lund, F.E. and T.D. Randall, Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(4): p. 236-47.
328. Godeau, B., et al., Rituximab efficacy and safety in adult splenectomy candidates with chronic immune thrombocytopenic purpura: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood*, 2008. 112(4): p. 999-1004.
329. Zaja, F., et al., Dexamethasone plus rituximab yields higher sustained response rates than dexamethasone monotherapy in adults with primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 2010. 115(14): p. 2755-62.
330. Alvarez-Roman, M.T., et al., Thrombopoietin receptor agonists in conjunction with oseltamivir for immune thrombocytopenia. *AIDS*, 2016. 30(7): p. 1141-2.
331. Bussel, J., et al., Fostamatinib for the treatment of adult persistent and chronic immune thrombocytopenia: Results of two phase 3, randomized, placebo-controlled trials. *Am J Hematol*, 2018. 93(7): p. 921-930.
332. Neunert, C., et al., The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*, 2011. 117(16): p. 4190-207.
333. Hayashi, S., et al., [Reticulated platelet determination: methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders]. *Rinsho Ketsueki*, 1999. 40(3): p. 205-12.
334. Sarpatwari, A., et al., Thromboembolic events among adult patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General Practice Research Database. *Haematologica*, 2010. 95(7): p. 1167-75.
335. Severinsen, M.T., et al., Risk of venous thromboembolism in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Br J Haematol*, 2011. 152(3): p. 360-2.
336. Norgaard, M., et al., Risk of arterial thrombotic and venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study. *Br J Haematol*, 2016. 174(4): p. 639-42.
337. Cheng, G., et al., Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet*, 2011. 377(9763): p. 393-402.
338. Lakshmanan, S. and A. Cuker, Contemporary management of primary immune thrombocytopenia in adults. *J Thromb Haemost*, 2012. 10(10): p. 1988-98.
339. Lambert, M.P. and T.B. Gernsheimer, Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood*, 2017. 129(21): p. 2829-2835.
340. Catala-Lopez, F., et al., Risk of thromboembolism with thrombopoietin receptor agonists in adult patients with thrombocytopenia: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Med Clin (Barc)*, 2015. 145(12): p. 511-9.
341. Thai, L.H., et al., Long-term complications of splenectomy in adult immune thrombocytopenia. *Medicine (Baltimore)*, 2016. 95(48): p. e5098.
342. McCormack, P.L., Eltrombopag: a review of its use in patients with severe aplastic anaemia. *Drugs*, 2015. 75(5): p. 525-31.
343. Qureshi, K., S. Patel, and A. Meillier, The Use of Thrombopoietin Receptor Agonists for Correction of Thrombocytopenia prior to Elective Procedures in Chronic Liver Diseases: Review of Current Evidence. *Int J Hepatol*, 2016. 2016: p. 1802932.
344. Guitton, Z., et al., Risk of thrombosis with anti-phospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus treated with thrombopoietin-receptor agonists. *Rheumatology (Oxford)*, 2018. 57(8): p. 1432-1438.

345. Provan, D. and A.C. Newland, Current Management of Primary Immune Thrombocytopenia. *Adv Ther*, 2015. 32(10): p. 875-87.
346. Rodeghiero, F. and M. Ruggeri, ITP and international guidelines: what do we know, what do we need? *Presse Med*, 2014. 43(4 Pt 2): p. e61-7.
347. Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg, The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(23): p. 11104-8.
348. Kaushansky, K., Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 1995. 86(2): p. 419-31.
349. Alvarez Roman, M.T., et al., Effects of thrombopoietin receptor agonists on procoagulant state in patients with immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 2014. 112(1): p. 65-72.
350. Koike, Y., et al., Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost*, 1998. 79(6): p. 1106-10.
351. Cesari, F., et al., Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*, 2008. 99(5): p. 930-5.
352. Monteagudo, M., et al., Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology. *QJM*, 2008. 101(7): p. 549-55.
353. Monteagudo, M., et al., [Relationship between reticulated platelets and megacaryocyte number in thrombocytopenic patients]. *Med Clin (Barc)*, 2009. 133(3): p. 81-5.
354. Briggs, C., et al., Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2004. 126(1): p. 93-9.
355. Rauber, P., et al., Immature platelet fraction and thrombopoietin in patients with liver cirrhosis: A cohort study. *PLoS One*, 2018. 13(2): p. e0192271.
356. Rinder, H.M., et al., Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med*, 1993. 117(6): p. 606-10.
357. Arellano-Rodrigo, E., [Role of reticulated platelets in the clinical evaluation of thrombocytopoiesis]. *Med Clin (Barc)*, 2009. 133(3): p. 95-7.
358. Vieira-de-Abreu, A., et al., Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol*, 2012. 34(1): p. 5-30.
359. Fogelson, A.L. and N.T. Wang, Platelet dense-granule centralization and the persistence of ADP secretion. *Am J Physiol*, 1996. 270(3 Pt 2): p. H1131-40.
360. Frelinger, A.L., 3rd, et al., Platelet Function in ITP, Independent of Platelet Count, Is Consistent Over Time and Is Associated with Both Current and Subsequent Bleeding Severity. *Thromb Haemost*, 2018. 118(1): p. 143-151.
361. Diacovo, T.G., et al., Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*, 1996. 88(1): p. 146-57.
362. Cerletti, C., G. de Gaetano, and R. Lorenzet, Platelet - leukocyte interactions: multiple links between inflammation, blood coagulation and vascular risk. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2010. 2(3): p. e2010023.
363. del Conde, I., et al., Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(5): p. 1065-70.
364. Andre, P., et al., Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(25): p. 13835-40.
365. Burger, P.C. and D.D. Wagner, Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*, 2003. 101(7): p. 2661-6.
366. Ay, C., et al., High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood*, 2008. 112(7): p. 2703-8.

367. Ay, C., et al., High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant. *Clin Chem*, 2007. 53(7): p. 1235-43.
368. Yanabu, M., et al., Platelet activation induced by an antiplatelet autoantibody against CD9 antigen and its inhibition by another autoantibody in immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 1993. 84(4): p. 694-701.
369. Garabet, L., et al., Effect of thrombopoietin receptor agonists on markers of coagulation and P-selectin in patients with immune thrombocytopenia. *Platelets*, 2017: p. 1-7.
370. Psaila, B., et al., Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, 2011. 9(11): p. 2302-10.
371. Han, Y., et al., Redistribution of glycoprotein Ib within platelets in response to protease-activated receptors 1 and 4: roles of cytoskeleton and calcium. *J Thromb Haemost*, 2003. 1(10): p. 2206-15.
372. Michelson, A.D., et al., Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vivo wound. *Blood*, 1991. 77(4): p. 770-9.
373. LaRosa, C.A., et al., Neutrophil cathepsin G modulates the platelet surface expression of the glycoprotein (GP) Ib-IX complex by proteolysis of the von Willebrand factor binding site on GPIb alpha and by a cytoskeletal-mediated redistribution of the remainder of the complex. *Blood*, 1994. 84(1): p. 158-68.
374. Erwig, L.P. and P.M. Henson, Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 2008. 15(2): p. 243-50.
375. Savill, J. and V. Fadok, Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 784-8.
376. Mitchell, W.B., et al., Effect of thrombopoietin receptor agonists on the apoptotic profile of platelets in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Am J Hematol*, 2014. 89(12): p. E228-34.
377. Goette, N.P., et al., Platelet Apoptosis in Adult Immune Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by Auto-Antibodies. *PLoS One*, 2016. 11(8): p. e0160563.
378. Schoenwaelder, S.M., et al., Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*, 2009. 114(3): p. 663-6.
379. Martin, M., et al., Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes. *Thromb Haemost*, 2013. 109(5): p. 909-19.
380. Winkler, J., et al., Platelet apoptosis in paediatric immune thrombocytopenia is ameliorated by intravenous immunoglobulin. *Br J Haematol*, 2012. 156(4): p. 508-15.
381. Lopez, E., et al., Role of mTOR1 and mTOR2 complexes in MEG-01 cell physiology. *Thromb Haemost*, 2015. 114(5): p. 969-81.
382. Fager, A.M., et al., Properties of procoagulant platelets: defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(12): p. 2400-7.
383. Fernandez Bello, I., et al., Factors Involved in Maintaining Haemostasis in Patients with Myelodysplastic Syndrome. *Thromb Haemost*, 2018. 118(4): p. 734-744.
384. Morel, O., et al., Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. 31(1): p. 15-26.
385. Connor, D.E., D.D. Ma, and J.E. Joseph, Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thromb Res*, 2013. 132(5): p. 572-7.

386. Jy, W., et al., Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. *Thromb Haemost*, 2013. 110(4): p. 751-60.
387. Ando, M., et al., Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int*, 2002. 62(5): p. 1757-63.
388. Goubran, H., et al., Platelet microparticles and cancer: An intimate cross-talk. *Transfus Apher Sci*, 2015. 53(2): p. 168-72.
389. van der Meijden, P.E., et al., Key role of integrin α (IIb) β (3) signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69(20): p. 3481-92.
390. Petrie, M.S., et al., Production of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by endothelial cells: differential responses to calcitriol and paricalcitol. *J Thromb Haemost*, 2004. 2(12): p. 2266-7.
391. Booth, N.A., et al., Lysis of platelet-rich thrombi: the role of PAI-1. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. 667: p. 70-80.
392. Brogren, H., et al., Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood*, 2004. 104(13): p. 3943-8.
393. Brogren, H., et al., Platelets Retain High Levels of Active Plasminogen Activator Inhibitor 1. *PLoS One*, 2011. 6(11).
394. Madoiwa, S., et al., Developmental expression of plasminogen activator inhibitor-1 associated with thrombopoietin-dependent megakaryocytic differentiation. *Blood*, 1999. 94(2): p. 475-82.
395. Ostrowski, S.R., et al., Association between biomarkers of endothelial injury and hypocoagulability in patients with severe sepsis: a prospective study. *Crit Care*, 2015. 19(1).
396. Fruchter, O., M. Blich, and G. Jacob, Fatal acute myocardial infarction during severe thrombocytopenia in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci*, 2002. 323(5): p. 279-80.
397. Thiagarajan, P., et al., A monoclonal antibody to human platelet glycoprotein IIIa detects a related protein in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1985. 75(3): p. 896-901.
398. Lam, F.W., K.V. Vijayan, and R.E. Rumbaut, Platelets and their interactions with other immune cells. *Compr Physiol*, 2015. 5(3): p. 1265-80.
399. Li, J., et al., Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 7737.
400. Badlou, B.A., et al., Role of glycoprotein Iba α in phagocytosis of platelets by macrophages. *Transfusion*, 2006. 46(12): p. 2090-9.
401. Hoffmeister, K.M., et al., Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. *Science*, 2003. 301(5639): p. 1531-4.
402. Josefsson, E.C., et al., The macrophage α M β 2 integrin α M lectin domain mediates the phagocytosis of chilled platelets. *J Biol Chem*, 2005. 280(18): p. 18025-32.
403. Rumjantseva, V., et al., Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets. *Nat Med*, 2009. 15(11): p. 1273-80.
404. Etulain, J. and M. Schattner, Glycobiology of platelet-endothelial cell interactions. *Glycobiology*, 2014. 24(12): p. 1252-9.
405. Murakami, Y., et al., Characterization of wheat germ agglutinin lectin-reactive glycosylated OmpA-like proteins derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 2014. 82(11): p. 4563-71.
406. Nagata, Y. and M.M. Burger, Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J Biol Chem*, 1974. 249(10): p. 3116-22.
407. Peters, B.P., et al., Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry*, 1979. 18(24): p. 5505-11.

408. Xu, W., et al., Lectin binding assays for in-process monitoring of sialylation in protein production. *Mol Biotechnol*, 2010. 45(3): p. 248-56.
409. Kauskot, A., et al., A mutation in the gene coding for the sialic acid transporter SLC35A1 is required for platelet life span but not proplatelet formation. *Haematologica*, 2018.
410. Sorensen, A.L., et al., Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood*, 2009. 114(8): p. 1645-54.
411. Jansen, A.J., et al., Sialidase inhibition to increase platelet counts: A new treatment option for thrombocytopenia. *Am J Hematol*, 2015. 90(5): p. E94-5.
412. Li, L., et al., Patterns and levels of platelet glycosylation in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Thrombolysis*, 2018. 45(1): p. 56-65.

9. PUBLICACIONES

Thrombosis and Haemostasis

Decision Letter (TH-18-10-0762.R1)

From: shosaku-n@mbp.ocn.ne.jp

To:

rauljustosanz@gmail.com,elenamonzonmanzano@hotmail.com,ihosvanyf@yahoo.es,talvarezroman@gmail.com,monica msalces@gmail.com,mirivas718@gmail.com,vjyuste@gmail.com, nora.butta@salud.madrid.org

CC: shosaku-n@mbp.ocn.ne.jp

Subject: Thrombosis and Haemostasis - Manuscript TH-18-10-0762.R1

Body: Dear Dr. Butta,

We are pleased to inform you that your revised manuscript, entitled "Platelet apoptosis and PAI- 1 are involved in the procoagulant state of immune thrombocytopenia patients treated with thrombopoietin receptor agonists" has been seen by the section editor and the referees, who recommended acceptance of your manuscript for publication in Thrombosis and Haemostasis.

If you would like your article to be published Open Access (e.g. as required by your funding source), please contact the Editorial Office immediately at elinor.switzer@thieme.de.

EDITORIAL COMMENTS:

Section Editor: Nomura, Shosaku

Comments to the Author:

no comments

REFEREE COMMENTS:

Referee: 1

Comments to the Author

This version is well revised.

Referee: 2

Comments to the Author

Typos in Figs legends

Proofs of your manuscript, as well as Author Statement, Copyright Transfer and Colour Figure agreement (if your paper contains colour figures) forms will be sent in due course.

Many thanks for submitting your work to Thrombosis and Haemostasis, and we look forward to working with you again in the near future.

Yours sincerely,

Prof. Shosaku Nomura, Section Editor

Prof. Gregory Lip, Editor-in-Chief [Clinical Studies]

Thrombosis and Haemostasis

www.thrombosis-online.com

<https://mc.manuscriptcentral.com/th>

Date Sent: 12-Dec-2018

Thrombosis and Haemostasis

**Thrombosis
and
Haemostasis**
International Journal
for Vascular Biology and Medicine

**Platelet apoptosis and PAI-1 are involved in the
procoagulant state of immune thrombocytopenia patients
treated with thrombopoietin receptor agonists**

Journal:	<i>Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID:	TH-18-10-0762.R1
Manuscript Type:	Original Article: Cellular Haemostasis and Platelets
Category:	Clinical Studies
Date Submitted by the Author:	08-Dec-2018
Complete List of Authors:	Justo Sanz, Raul; Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ Monzón Manzano, Elena; Hospital Universitario La Paz-IdiPaz Fernandez, Ihosvany; Hospital Universitario La Paz-Idipaz Alvarez, Maria Teresa; Hospital Universitario La Paz-IdiPaz Martin-Salces, Monica; Hospital Universitario La Paz-IdiPaz Rivas, Isabel; Hospital Universitario La Paz-IdiPaz Jimenez-Yuste, Victor; Hospital Universitario La Paz-Idipaz; Universidad Autónoma de Madrid Butta, Nora; Hospital La Paz-IDIPaz
Keywords:	immune thrombocytopenia, platelet apoptosis, PAI-1, Thrombopoietin receptor agonists, platelet function

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4 1 **Platelet apoptosis and PAI-1 are involved in the procoagulant state of immune**
5
6 2 **thrombocytopenia patients treated with thrombopoietin receptor agonists**
7
8
9 3 Raul Justo Sanz¹, Elena Monzón Manzano¹, Ihosvany Fernández Bello¹, M^a Teresa
10
11 4 Álvarez Román¹, Mónica Martín Salces¹, M^a Isabel Rivas Pollmar¹, Víctor Jiménez
12
13 5 Yuste^{1,2} and Nora V. Butta¹.
14
15
16 6 ¹Hematology Unit, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261,
17
18 7 Madrid 28046, Spain.
19
20
21 8 ²Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, Madrid 28029, Spain.
22
23
24 9
25
26
27
28
29 10 Corresponding author: nora.butta@salud.madrid.org
30
31
32
33 11 Running title: Haemostasis in TPO-RAs treated ITP patients
34
35
36 12 Abstract word count: 198
37
38
39 13 Manuscript word count: 4197
40
41
42
43 14 Figures: 6
44
45
46 15 Tables: 4
47
48
49 16
50
51
52 17
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

The treatment goal for patients with immune thrombocytopenia (ITP) is to raise platelet counts to levels that minimize or stop bleeding. Thrombopoietin receptor agonists (TPO-RAs) have been successfully and extensively employed as second-line therapy for ITP. However, TPO-RAs have a small but significant increase in the risk of thrombosis.

The aim of this study was to elucidate the mechanisms involved in the procoagulant effect of TPO-RAs to take them into account when considering their use in ITP patients with concomitant diseases/conditions that might increase risk of suffering thrombotic events.

Eighty-two patients with chronic primary ITP (40 untreated and 42 undergoing TPO-RA therapy) and 112 healthy individuals were recruited.

The patients with ITP undergoing TPO-RA therapy presented a procoagulant profile due to the formation of a more fibrinolysis-resistant clot because of increased plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. Increase in platelet content of PAI-1 might be the result of the effect of TPO-RA during megakaryopoiesis, as suggested by experiments performed in MEG-01 cells. Moreover, patients under TPO-RA treatment presented an enhanced procoagulant activity associated with microparticles and an increased platelet apoptosis that causes a higher exposure of phosphatidylserine and, consequently, a larger surface for the binding of the prothrombinase complex.

Keywords: immune thrombocytopenia, platelet apoptosis, PAI-1, Thrombopoietin receptor agonists, platelet function

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

42 SUMMARY TABLE

43 What is known on this topic:

- 44 • TPO-RAs have been successfully employed as second-line therapy for ITP.
- 45 • TPO-RAs have a small but significant increase in the risk of thrombosis.

46

47 What this paper adds:

- 48 • The patients with ITP undergoing TPO-RAs treatment presented a procoagulant
49 profile due to the formation of a more fibrinolysis-resistant clot because of
50 increased plasma and platelet PAI-1 levels.
- 51 • Moreover, platelets from TPO-RA treated ITP patients presented an increased
52 apoptosis that causes a higher exposure of phosphatidylserine and,
53 consequently, a larger surface for the binding of the prothrombinase complex.
- 54 • Hypercoagulability caused by TPO-RAs should be taken into account when
55 deciding which platelet count should be reached to avoid either hemorrhagic or
56 thrombotic complications in ITP patients.

58 INTRODUCTION

59 Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease characterized by a low
60 platelet count ($\leq 100 \times 10^9/L$) due to platelet destruction and insufficient platelet
61 production (1). Patients with a similar platelet count can have different bleeding
62 manifestations (2), and some seldom bleed despite having a very low platelet count.
63 This fact suggests that factors other than the platelet count are involved in maintaining
64 hemostasis within a physiological range in patients with ITP. Supporting this, Frelinger
65 III et al reported that platelet function in ITP is consistent over time and is associated
66 with bleeding severity (3). Moreover, we and other authors have reported an increase
67 in platelet-derived and red blood cell-derived **microparticles (MPs)** in patients with ITP
68 (4-6), both with a broad hemostatic activity. So, compensatory mechanisms to
69 thrombocytopenia seem to exist and although they might appear somewhat
70 protective, under certain circumstances, might be responsible for the slight but
71 increased risk of thrombosis in patients with ITP (7, 8). Álvarez Román et al, in a study
72 of hemostasis performed using rotational thromboelastometry (ROTEM®), reported
73 that patients with ITP showed a procoagulant profile. However, a wide range of clot
74 formation profiles were observed (6). Considering that thrombotic complications in
75 patients with ITP could be due to the disease itself (9, 10) or a consequence of ITP
76 therapy (11-13), the variations observed in the study by Álvarez Román (6) could rely
77 on differences in therapy received by patients from that study's cohort.
78 Among the drug therapies for ITP, thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA,
79 romiplostim; Nplate®; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA; and eltrombopag; Promacta®,
80 Revolade®, Novartis, Basilea, Switzerland) are being successfully and extensively

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

81 employed as second-line therapy. However, TPO-RAs have a small but significant risk
82 of thrombosis (14, 15).

83 Considering that the use of TPO-RAs for treating ITP and other thrombocytopenias is
84 increasingly widespread (16-18), we aimed to elucidate the mechanisms involved in
85 the procoagulant effect of TPO-RAs to take them into account for achieving a global
86 hemostasis as physiological as possible.

87 **METHODS**

88 **Subjects and study design**

89 A prospective, observational and transversal study was conducted with 82 patients
90 with chronic primary ITP, as defined by Rodeghiero (1), and 112 healthy individuals
91 recruited from the Blood Donor Section of the Hematology Unit of La Paz University
92 Hospital.

93 The study excluded patients with uncontrolled hypertension, hyperlipidemia,
94 peripheral or coronary artery diseases, abnormal hepatic or renal function, those
95 undergoing therapy with platelet-active drugs and those who had undergone a
96 transfusion within 15 days of the study.

97 The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the experimental protocol.

98 The research study was conducted in compliance with the Helsinki Declaration and
99 after receiving signed patient informed consent.

100 **Preparation of platelet-rich plasma and washed platelets**

1
2
3
4 101 Human peripheral blood samples were collected in standard 3.8% sodium citrate and
5
6 102 EDTA tubes (BD, Madrid, Spain). Blood cell counts were performed with a Coulter AcT
7
8 103 Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain).
9
10
11 104 Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by whole **citrated** blood centrifugation (150 g
12
13
14 105 for 20 min at 23 °C). To obtain washed platelets, the top two-thirds of the PRP volume
15
16 106 were collected and centrifuged (650 g for 10 min at 23 °C) after adding acid-citrate-
17
18 107 dextrose (ACD, 1:10). The pellet was resuspended in an equal volume of HEPES buffer
19
20
21 108 (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl and 1 mM MgSO₄, pH 7.4).
22
23
24 109 Platelet-free plasma (PFP) was obtained by centrifuging at 1500 g for 15 min at 23 °C,
25
26
27 110 followed by 2 additional centrifugations (the first for 15 min at 1500 g; the second for
28
29 111 2 min at 13,000 g). PFP aliquots were stored at -80 °C until analysis.
30
31
32
33 112 All samples were analyzed or stored properly within 2 hours of sampling.
34
35
36 113 **Plasma thrombopoietin**
37
38
39 114 EDTA-anticoagulated whole blood was centrifuged at 1000 g for 15 min at 23 °C to
40
41
42 115 obtain platelet-poor plasma (PPP). PPP was stored at -80 °C until the assay. Plasma
43
44 116 TPO concentrations were determined by a commercially available enzyme-linked
45
46 117 immunosorbent assay (ELISA, Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN), according
47
48 118 to the manufacturer's instructions.
49
50
51
52 119 **Assay of reticulated platelets**
53
54
55 120 Reticulated platelets (RP) were measured as previously described (19). Briefly, after
56
57 121 PRP preparation, washed platelets were fixed in 1% formaldehyde for 15 min at **room**
58
59
60 122 **temperature (RT)** to minimize nonspecific staining and resuspended in phosphate-

1
2
3 123 buffered saline. Fifty microliters of this suspension were mixed with 5 μ L of
4
5 124 phycoerythrin (PE)- α IIb monoclonal antibody (mAb) (BioCytex, Marseille, France) and
6
7 125 incubated for 30 min at RT. Next, 600 μ L of phosphate-buffered saline and 100 μ L of
8
9 126 Retic-COUNT (thiazole orange; Becton Dickinson, San Jose, CA) were mixed and
10
11 127 incubated for 2 hours at RT. Samples were analyzed in a flow cytometer (FACScan flow
12
13 128 cytometer, BD Biosciences, Madrid, Spain).
14
15
16
17

18 129 **Determination of platelet activation**

19
20
21
22 130 PRP was diluted 1:5 with HEPES buffer and incubated with or without 100 μ mol/L
23
24 131 thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland) at RT. Following
25
26 132 incubation, fluorescein-isothiocyanate (FITC)-anti-P-selectin mAb (BD Pharmingen, San
27
28 133 Diego, CA), FITC anti-CD63 mAb (BD, Madrid, Spain) or FITC-PAC1 (BD, Madrid, Spain),
29
30 134 a mAb that recognizes activated conformation of fibrinogen receptor, was added for
31
32
33 135 15 min at RT. After incubation, platelets were diluted in HEPES buffer for flow
34
35
36 136 cytometry analysis.
37
38
39

40 137 **Rotational thromboelastometry**

41
42
43 138 Using a viscoelastometric clotting test (ROTEM[®], Pentapharm, Munich, Germany), we
44
45 139 evaluated the kinetics of clot formation and fibrinolysis.
46
47
48
49 140 ROTEM[®] was performed on fresh PRP adjusted to 25×10^9 platelets/L with PPP from the
50
51 141 same participant. The samples were allowed to rest at RT for 30 min before testing.
52
53 142 Recalcification (naTEM[®]) was performed to assess the kinetics of clot formation. We
54
55
56 143 recorded the clotting time (CT, time from the start of measurement to the start of
57
58 144 clotting, in seconds); clot formation time (CFT, time from the start of clotting to 20 mm
59
60

145 of amplitude, in seconds, which reflects the speed of the clotting process); alpha angle
146 (tangent to the curve at 2 mm amplitude, in degrees, which reflects the rate of fibrin
147 polymerization); amplitude at time "x" (Ax, in mm); maximum clot firmness (MCF, in
148 mm, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus); and lysis at 60 min
149 (LI60, in %; residual clot firmness 60 minutes after CT).

150 **Measurement of phosphatidylserine exposure on platelet surface and activity of**
151 **caspases**

152 The surface exposure of phosphatidylserine (PS) in washed platelets was assessed by
153 measuring the binding of FITC-labeled Annexin V (BD Pharmingen, Madrid, Spain).
154 Briefly, washed platelets were resuspended in Annexin V binding buffer (10-mM
155 HEPES, 10-mM NaOH, 140-mM NaCl, 2.5-mM CaCl₂, pH 7.4) and labelled with FITC-
156 Annexin V. After incubation for 15 min at RT in the dark, samples were analyzed by
157 flow cytometry.

158 To analyze active caspase-3,7, -8 or -9, PRP was diluted 10-fold with isotonic HEPES
159 buffered saline with Ca²⁺ (5 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 0.42 mM
160 NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂; 12 mM NaHCO₃; 0.35% bovine serum albumin; 5
161 mM dextrose, pH 7.4) containing 2 mM Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP, SIGMA-Aldrich,
162 Madrid, Spain) to prevent fibrin formation. We then added PE-labelled mAb to α2b
163 and FAM-DEVD-FMK, FAM-LETD-FMK or FAM-LEHD-FMK (Millipore, Madrid, Spain) to
164 the samples and analyzed them by flow cytometry.

165 **Determination of microparticle procoagulant activity**

1
2
3
4 166 MP procoagulant activity was determined in PFP with the ZYMUPHEN MP-Activity kit
5
6 167 (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France) following the manufacturer's instructions.
7
8 168 This kit is based on a prothrombinase assay after MP capture on a microtitration plate
9
10 169 coated with streptavidin and biotinylated annexin V.
11
12
13
14 170 **Prothrombinase complex binding to platelets**
15
16
17 171 Quiescent washed platelets (1×10^8 /mL) were incubated with activated factor X (FXa, 5
18
19 172 nmol/L) and activated factor V (FVa, 5 nmol/L) obtained from Haematologic
20
21
22 173 Technologies Inc. (Cellsystems, Germany). Following fixation to cross-link platelet-
23
24 174 bound FVa and FXa, specific or control monoclonal antibodies (0.1 μ M each,
25
26
27 175 Haematologic Technologies Inc, Germany) were added. After washing, FITC-conjugated
28
29 176 polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO, Spain) was added. An additional
30
31
32 177 aliquot was incubated with PE- α IIb mAb as control. After a 20-min incubation-period
33
34 178 and washing, the samples were analyzed by flow cytometry.
35
36
37 179 **In a separate set of experiments and in order to evaluate whether the presence of**
38
39 180 **antibodies may interfere with the binding of prothrombinase complex, washed**
40
41
42 181 **platelets from healthy controls were incubated during 30 min with Abciximab (5**
43
44
45 182 **μ g/ml, Janssen, Spain), an antibody that blocks fibrinogen receptor, before adding**
46
47 183 **FVa and FXa.**
48
49
50
51 184 **ELISA determinations**
52
53
54 185 The human urokinase-plasminogen activator (uPA) kit used was from R&D Systems
55
56 186 Europe Ltd. (Abingdon, United Kingdom); the tissue plasminogen activator (tPA) and
57
58 187 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) kits were obtained from eBioscience Ltd.
59
60

1
2
3
4 188 (Hatfield, United Kingdom); and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)
5
6 189 activity was from American Diagnostica (Pfungstadt, Germany). All these substances
7
8 190 were determined in PPP samples, following the manufacturer's instructions and
9
10
11 191 measured in Multiskan FC with an incubator (Thermo Scientific, Madrid, Spain). In
12
13 192 addition, PAI-1 was determined in washed platelets lysed by 5 freezing/thawing cycles.
14
15
16 193 **Cell culture and modification of protein expression in MEG-01 cells**
17
18
19 194 MEG-01 cells (generously provided by Dr. Redondo, University of Extremadura,
20
21
22 195 Cáceres, Spain) were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium
23
24 196 (Gibco, Madrid, Spain), supplemented with 10% fetal bovine serum (ICN, Madrid,
25
26
27 197 Spain), 100 U/mL penicillin G (Gibco) and 100 µg/mL streptomycin (Gibco), at 37 °C and
28
29 198 5% CO₂ (3×10⁵ cells/mL). Three MEG-01 cell cultures were initiated simultaneously:
30
31
32 199 control without drugs and stimulated by either TPO (100 ng/mL) or romiplostim (53
33
34 200 µg/mL). Samples were collected at the start and after 24, 48 and 72 hours to
35
36
37 201 determine the PAI-1 content or 72 h and 1 week to measure caspase-3,7, -8 or -9
38
39 202 activity.
40
41
42 203 **PAI-1 content in MEG-01 cells**
43
44
45
46 204 The endogenous PAI-1 content in the MEG-01 cells was determined by Western blot.
47
48 205 Washed cells were lysed with Triton buffer (1% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 300
49
50 206 mM NaCl and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride in phosphate-buffered saline [PBS])
51
52
53 207 containing a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA free; Roche,
54
55 208 Barcelona, Spain). Fifty µg of MEG-01 protein lysates underwent sodium dodecyl
56
57
58 209 sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in reduced conditions. Then the
59
60

1
2
3
4 210 proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane with a Trans-blot semidry
5
6 211 transfer cell (Bio-Rad, Madrid, Spain). Membranes were first blotted with mAb against
7
8 212 PAI-1 and then against tubulin (both from Santa Cruz Biotech Inc, Santa Cruz, CA) as a
9
10 213 sample charge control. The membranes were then incubated with an anti-Mouse IgG
11
12 214 antibody conjugated with horseradish peroxidase. Membranes were revealed by
13
14 215 enhanced chemiluminescence (Merck, Madrid, Spain), and densitometric analyses
15
16 216 were performed with Alliance 2.7 imaging system (UVITEC Cambridge, UK).
17
18
19
20
21 217 **Caspase activity in MEG-01 cells**
22
23
24 218 Caspase activity was determined by flow cytometry using Millipore kits, as described
25
26 219 above for platelets.
27
28
29
30 220 **Statistics**
31
32
33 221 **To calculate minimum sample size, G*Power software (Heinrich Heine, Dusseldorf**
34
35 222 **University) was used. A minimum sample of 25 participants per group would provide**
36
37 223 **80% power at two tails to detect a difference between groups, assuming a 5% level**
38
39 224 **of significance.**
40
41
42
43
44 225 Experimental data was analysed using SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). The
45
46 226 Shapiro-Wilk test was used to test the normal distribution. To compare multiple
47
48 227 groups, one-way ANOVA or non parametric Kruskal-Wallis, using Dunn's multiple
49
50 228 comparison post-hoc test were performed. All tests were two-tailed, and the level of
51
52 229 statistical significance was set at $p < 0.05$.
53
54
55
56 230 **RESULTS**
57
58
59
60 231 **Patient population**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

232 Forty patients ITP patients without treatment for at least six months (75% women,
233 mean age of 51 ± 7 years) (Table 1) and 42 patients with ITP responders to TPO-RA
234 therapy (54.7% women, mean age of 64 ± 8 years; 64.3% with eltrombopag, 35.7 % with
235 romiplostim) (Table 2) were included. Response to TPO-RA therapy was defined as
236 reaching a platelet count $>30 \times 10^9/L$ and at least 2-fold increase the baseline count and
237 absence of bleeding (1). One hundred and twelve healthy participants (55% women,
238 mean age of 57 ± 25 years) were also recruited.

239 **The percentage of individuals in each group that presented biochemical parameters**
240 **out of normal range are shown in Table 3.**

241 All patients treated with TPO-RA had previously been treated with corticosteroids and
242 intravenous immunoglobulin, among other therapies and five of them had undergone
243 a splenectomy. None of them had history of thrombotic events.

244 **Platelet count, immature platelets and thrombopoietin plasma levels**

245 As shown in Figure 1A, the platelet counts for the untreated (UT) and TPO-RA-treated
246 groups were significantly lower than for the controls, whereas the proportion of
247 immature platelets in all patients with ITP was higher (Figure 1B).

248 TPO plasma levels were higher in the patients with ITP than in the healthy controls,
249 although statistical significance was only achieved in the TPO-RA-treated group (Figure
250 1C).

251 **Global hemostasis in patients with immune thrombocytopenia responders to**
252 **thrombopoietin receptor agonists**

1
2
3 253 The ROTEM® studies showed significant differences in the dynamics of clot formation
4
5 254 when comparing the control with ITP samples.
6
7
8
9 255 There was a delay in clot formation in the UT-ITP group, as observed by a prolonged CT
10
11 256 [expressed as median (p25-p75): control: 516 (490, 633) s; UT-ITP: 938 (914, 1348) s,
12
13 257 $p < 0.001$], and a diminished alpha angle (control: 61.7 ± 5.6 degrees; UT-ITP: 49.2 ± 7.3
14
15 258 degrees, $p < 0.05$). Nevertheless, samples from patients with UT-ITP reached the same
16
17 259 MCF as those from healthy controls (control: 45.3 ± 2.4 mm; UT-ITP: 46.9 ± 3.7 mm). On
18
19 260 the other hand, patients with ITP undergoing TPO-RA therapy presented an initial clot
20
21 261 formation similar to that of the control group [expressed as median (p25-p75): CT, 672
22
23 262 (598, 928) s; alpha angle, 55.8 ± 5.8 degrees] but achieved a higher MCF (53.1 ± 4.5 mm,
24
25 263 $p < 0.05$) and a reduced clot lysis after 60 min (control: $91.8 \pm 4.0\%$; UT-ITP: $93.7 \pm 4.0\%$,
26
27 264 TPO-RA ITP: 97.6 ± 1.7 , $p < 0.05$) (Figure 2).
28
29
30
31
32
33
34 265 **Functional state of platelets from patients with immune thrombocytopenia**
35
36
37 266 Platelets from all patients with ITP had a defect in their ability to be activated, as
38
39 267 shown by the lower PAC1 binding (Figure 3A) and surface exposure of P-selectin
40
41 268 (Figure 3B) and CD63 (Figure 3C) after stimulation with TRAP. Nevertheless, patients
42
43 269 with ITP undergoing therapy with TPO-RA showed an increased basal exposure of P-
44
45 270 selectin (Figure 3B).
46
47
48
49
50
51 271 **Microparticle-associated procoagulant activity in patients with immune**
52
53 272 **thrombocytopenia undergoing therapy with thrombopoietin receptor agonists**
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

273 The patients with ITP on treatment with TPO-RA showed a significantly higher
274 procoagulant capacity of MPs associated to PS than the control and UT-ITP groups
275 (control, 5.5 ± 2.3 nmol/L; UT-ITP, 5.0 ± 2.8 nmol/L; TPO-RA, 11.9 ± 5.1 nmol/L, $p < 0.05$).

276 **Apoptosis in platelets from patients with immune thrombocytopenia**

277 Platelets from patients with ITP exposed more PS than controls, and this increase was
278 higher in the group treated with TPO-RA (Figure 4A). This situation was accompanied
279 by an increased activity of caspases-3,7, -8 and -9 (Figure 4B).

280 **Prothrombinase complex binding to quiescent platelets**

281 We evaluated whether PS was functional for anchoring the prothrombinase complex.
282 Binding of FVa and FXa onto the platelet membrane surface was higher in quiescent
283 platelets from patients with ITP undergoing therapy with TPO-RA (Figure 4C).

284 **In order to evaluate whether the presence of antibodies may interfere with the**
285 **binding of prothrombinase complex, the effect of preincubating platelets with**
286 **Abciximab was tested. Presence of this antibody did not modify either binding of FVa**
287 **[without Abciximab (%): 29.1 ± 10.1 , with Abciximab (%): 33.1 ± 3.6] or binding of FXa**
288 **[without Abciximab (%): 36.9 ± 18.9 , with Abciximab (%): 37.3 ± 9.3].**

289 **Effect of thrombopoietin receptor agonists on caspases activity in MEG-01 cells**

290 To elucidate whether increments in the platelet's caspase activity were due to TPO-RA
291 therapy, the effect of TPO and romiplostim were tested on MEG-01 cells. These
292 treatments significantly increased the activity of caspase -3,7, -8 and -9 with a different
293 temporal sequence (Figure 5).

1
2
3
4 294 **Fibrinolysis in patients with immune thrombocytopenia undergoing therapy with**
5
6 295 **thrombopoietin receptor agonists**
7
8
9 296 The increased LI60 values in the patients with ITP undergoing therapy with TPO-RA
10
11 297 might be due to an imbalance in fibrinolysis-related proteins. No intergroup
12
13 298 differences were observed for tPA and uPA antigenic plasma levels and TAFI plasma
14
15 299 activity (Table 4). On the contrary, PAI-1 plasma levels were increased in patients with
16
17 300 ITP treated with TPO-RA (Figure 6A). Since platelets are a source of PAI-1, we
18
19 301 measured their endogenous content. As observed in Figure 6B, PAI-1 was increased in
20
21 302 the platelets from patients with ITP treated with TPO-RA.
22
23
24
25
26
27 303 To determine whether TPO-RA might be responsible for increased platelet PAI-1
28
29 304 content, experiments were performed in MEG-01 cells incubated with buffer, with TPO
30
31 305 or with romiplostim. As shown in Figure 6C, both drugs increased the endogenous
32
33 306 content of PAI-1 but increment only reached significance after 48 hours of treatment.
34
35
36
37 307 **DISCUSSION**
38
39
40
41 308 TPO-RA (romiplostim and eltrombopag) therapy is the most recent clinical
42
43 309 development to change the landscape of second-line ITP therapy (20). One of the
44
45 310 concerns regarding TPO-RA is its small but significant increase in the risk of thrombosis
46
47 311 (14, 15).
48
49
50
51 312 Our results show that the patients with ITP undergoing therapy with TPO-RA presented
52
53 313 a procoagulant profile because of the formation of a more fibrinolysis-resistant clot
54
55 314 due to increased PAI-1 levels, enhanced MP-associated procoagulant activity and
56
57
58
59
60

1
2
3
4 315 increased platelet apoptosis, causing greater exposure of PS and, consequently, the
5
6 316 availability of a larger surface for prothrombinase complex binding.
7
8
9 317 A recent meta-analysis of eltrombopag in ITP examined 6 randomized controlled trials
10
11 318 demonstrating that eltrombopag significantly improved platelet counts and decreased
12
13 319 the incidence of bleeding (21). As reported in the literature, a number of patients who
14
15
16 320 were either intolerant or refractory to one of the TPO-RA therapies successfully
17
18 321 switched to the other (22).
19
20
21
22 322 The results for a 3-year follow-up of patients in an open-label extension study for
23
24 323 continued dosing of eltrombopag showed that the rate of thromboembolic events was
25
26 324 3.17 per 100 patient-years (23). These data were recently updated at 5 years, with 6%
27
28
29 325 of patients having thromboembolic events (24).
30
31
32 326 Haselboeck et al (25) described the development of venous thromboses during
33
34 327 eltrombopag therapy in 2 of 11 patients, with no association with any distinct single
35
36
37 328 platelet function from the evaluated parameters. This might be because no
38
39 329 measurements were performed for platelet PS exposure, the amount of MPs or the
40
41
42 330 fibrinolytic system (present results).
43
44
45
46 331 For romiplostim, the rate of thromboembolic events was 5.5 per 100 patient-years for
47
48 332 both romiplostim and placebo-treated patients (26).
49
50
51 333 Large randomized clinical trials on ITP have shown that the occurrence of venous
52
53 334 thrombosis was not related to platelet count or type or dose of TPO-RA (27).
54
55
56
57 335 In any case, these thrombotic events reported for TPO-RA are lower than those
58
59 336 reported for patients with ITP who underwent splenectomy (28).
60

1
2
3 337 ROTEM® analyses of hemostasis showed that patients with UT-ITP had a delay in clot
4
5 338 formation that was overcome in TPO-RA-treated patients. Moreover, this group
6
7 339 showed increased MCF and hypofibrinolysis. The effect of TPO-RA on MCF might be
8
9 340 related to platelet reactivity. A study reported that immature platelets had increased
10
11 341 *in vitro* thrombogenicity (29), but this finding does not seem to be related to the
12
13 342 prothrombotic profile observed in TPO-RA-treated patients because both ITP groups
14
15 343 had similar immature platelet counts. Neither group seems to be related to the
16
17 344 fibrinogen receptor's ability to be stimulated because it is impaired to the same extent
18
19 345 in platelets from both groups. Since platelets from TPO-RA-treated patients in
20
21 346 quiescent conditions exposed more P-selectin on their surface than untreated patients
22
23 347 with ITP and healthy controls, there is the possibility of an enhanced interaction with
24
25 348 another blood cell type (3, 30). Frelinger et al (2018) also reported that platelets from
26
27 349 children with ITP undergoing a variety of therapies had increased P-selectin exposure
28
29 350 in quiescent conditions but a reduced exposure after adenosine diphosphate (ADP)
30
31 351 stimulation. These authors hypothesized that the fibrinogen receptor's reduced
32
33 352 activation ability and capability to release P-selectin from granules might be a
34
35 353 consequence of either the presence of platelet autoantibodies that cause platelet
36
37 354 activation and release of platelet granule contents (31) or a desensitization of the
38
39 355 platelet response to ADP. This latter explanation seems to be the most plausible
40
41 356 because we did not find activated platelets in basal conditions, and approximately 30-
42
43 357 40% of the cases had no detectable antiplatelet antibody levels. Garabet et al (32) also
44
45 358 observed higher plasma soluble P-selectin levels and proposed its contribution to the
46
47 359 increased risk of thrombotic events.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 360 Platelets from patients with ITP had more apoptosis signals than those from healthy
5
6 361 controls (33). Externalization of PS onto the surface of cells undergoing apoptosis
7
8 362 represents an "eat me" signal that leads to the clearance of apoptotic platelets and
9
10 363 worsens thrombocytopenia (34, 35). Our results agree with Deng's observation and
11
12 364 showed that platelets from patients with ITP on treatment with TPO-RA had enhanced
13
14 365 apoptosis compared with those from UT-ITP patients. In contrast to our results,
15
16 366 Mitchell et al (36) reported that TPO-RA therapy of patients with ITP induced platelet
17
18 367 resistance to apoptosis and, consequently, to the extension of their circulating life
19
20 368 span. This difference might be explained by the fact that this effect lasts for only 14
21
22 369 days and patients included in our cohort were undergoing TPO-RA therapy for longer
23
24 370 than 2 weeks. **This observation suggests that the effect of TPO-RA is dependent on**
25
26 371 **the extent of the treatment. If this were the case, one of the limitations of our study**
27
28 372 **could be different time our cohort of ITP patients have been receiving TPO-RA**
29
30 373 **treatment. It would be interesting to perform a longitudinal study in a cohort of ITP**
31
32 374 **patients taking samples before starting TPO-RA treatment until at least 3-6 months**
33
34 375 **after to test time-dependence of TPO-RA effect on platelet apoptosis.**
35
36 376 Goette et al (37) reported no differences between ITP and control platelets either in
37
38 377 basal PS exposure or in caspase-3 activity, but an enhanced response to an apoptotic
39
40 378 stimulus in platelets from patients with ITP. Moreover, these authors observed a
41
42 379 decline in platelet apoptosis in 3 patients undergoing therapy with eltrombopag. As
43
44 380 the authors discussed, this effect might be due to less sensitivity to platelet apoptosis
45
46 381 and activation of the pro-survival Akt signaling pathway observed during the first week
47
48 382 of TPO-RA therapy (36).
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 383 PS exposed at the surface of platelets provides a negatively-charged scaffold for the
4
5 384 binding of calcium-dependent coagulation enzymatic complexes and provides a
6
7 385 catalytic surface for the tenase and/or prothrombinase complexes that promote
8
9 386 thrombin generation (38). In support of a functional role for exposed PS, we observed
10
11 387 increased binding of FVa and FXa in platelets from patients undergoing TPO-RA
12
13 388 therapy. Moreover, patients with ITP undergoing therapy with TPO-RA had higher
14
15 389 procoagulant capacity associated with PS from released MPs.
16
17
18
19
20
21 390 To evaluate whether the TPO-RA effect on platelets might be exerted at the
22
23 391 megakaryocyte level, we tested the effects of romiplostim on MEG-01 cells. MEG-01 is
24
25 392 a highly undifferentiated human megakaryoblastic cell line that can be easily matured
26
27 393 to platelet-like particles (39). We observed that TPO and romiplostim induced MEG-01
28
29 394 cell maturation due to a time-dependent increase in caspase activity. Similar results
30
31 395 were reported by López et al (40), with increased caspase-9 activity in MEG-01 that
32
33 396 reached its peak after 6 days of TPO therapy.
34
35
36
37
38
39 397 The hypofibrinolysis observed in our study could be due, at least in part, to the
40
41 398 increased PAI-1 levels. The patients with ITP treated with TPO-RA had higher plasma
42
43 399 PAI-1 levels than the healthy controls. Similar results were reported by Garabet et al
44
45 400 (32); however, these authors failed to detect the plasma levels in the healthy controls,
46
47 401 making it more difficult to interpret their results despite having performed them with
48
49 402 the best analyses possible under their circumstances. Platelets have been identified as
50
51 403 a major storage area for plasma PAI-1, accounting for more 90% of circulating PAI-1
52
53 404 (41). Platelets contain considerable amounts of translationally active mRNA for PAI-1,
54
55 405 and there is ongoing *de novo* PAI-1 synthesis in an active configuration (42).
56
57
58
59
60

Our results showed a higher content of PAI-1 in platelets from TPO-RA-treated patients. The possibility that TPO and their receptor agonists might increase PAI-1 mRNA levels in megakaryocytes is supported by the present results (the effect of TPO and romiplostim on MEG-01 cells) and by a previous study that showed that TPO increased PAI-1 levels in a megakaryocytic leukemia cell line (UT-7) and in TPO-differentiated human cord blood CD34⁺/CD41⁻ cells to CD34⁺/CD41⁺ cells (43). Considering that the goal of ITP therapy is to prevent episodes of bleeding, additional procoagulant mechanisms involved in maintaining hemostasis in patients treated with TPO-RA might be considered a beneficial factor rather than a detrimental one that does not require the recovery of a normal platelet count. **Nevertheless, in the presence of comorbidities (e.g., advanced age, smoking, oral contraception and lifestyle considerations), these prothrombotic events might be taken under consideration for the choice of the therapeutic agent and its dose.** Our results suggest that measurement of global hemostasis, thrombogenic capacity of MPs and fibrinolysis should be incorporated in clinical practice as a step towards a patient-oriented, precision medicine approach.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Redondo (University of Extremadura, Cáceres, Spain) for providing MEG-01 cells and the skillful collaboration of nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Hematology Unit of La Paz University Hospital. Authors' Contribution RJS, EMM and IFB performed the experiments. MTAR, MMS, MIRP and VJ-Y diagnosed, provided clinical care and verified patient information of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

429 immune thrombocytopenia patients. All authors analysed the results. NVB was the
430 principal investigator, designed the experiments and wrote the manuscript. All authors
431 approved the manuscript.

432 **CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE**

433 This work was supported by grants from the FIS-FONDOS FEDER (PI15/01457, NVB).
434 NVB holds a Miguel Servet II tenure track grant from FIS-FONDOS FEDER (CP14/00024).
435 NVB, MTAR, IFB, MMS, MIRP are Paid Instructors at Novartis.
436 NVB and MTAR are Consultants for Novartis.

437 **REFERENCES**

- 438 1. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology,
439 definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and
440 children: report from an international working group. Blood 2009; 113(11): 2386-93.
- 441 2. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the
442 investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood 2010;
443 115(2): 168-86.
- 444 3. Frelinger AL, 3rd, Grace RF, Gerrits AJ, et al. Platelet Function in ITP,
445 Independent of Platelet Count, Is Consistent Over Time and Is Associated with Both
446 Current and Subsequent Bleeding Severity. Thromb Haemost 2018; 118(1): 143-51.
- 447 4. Jy W, Horstman LL, Arce M, et al. Clinical significance of platelet microparticles
448 in autoimmune thrombocytopenias. J Lab Clin Med 1992; 119(4): 334-45.

- 1
2
3
4 449 5. Sewify EM, Sayed D, Abdel Aal RF, et al. Increased circulating red cell
5
6 450 microparticles (RMP) and platelet microparticles (PMP) in immune thrombocytopenic
7
8 451 purpura. *Thromb Res* 2013; 131(2): e59-63.
9
10 452 6. Alvarez-Roman MT, Fernandez-Bello I, Jimenez-Yuste V, et al. Procoagulant
11
12 453 profile in patients with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2016; 175(5): 925-
14
15 454 34.
16
17 455 7. Norgaard M, Cetin K, Maegbaek ML, et al. Risk of arterial thrombotic and
18
19 456 venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune
20
21 457 thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study. *Br J Haematol*
22
23 458 2015.
24
25 459 8. Doobaree IU, Nandigam R, Bennett D, et al. Thromboembolism in adults with
26
27 460 primary immune thrombocytopenia: a systematic literature review and meta-analysis.
28
29 461 *Eur J Haematol* 2016; 97(4): 321-30.
30
31 462 9. Sarpatwari A, Bennett D, Logie JW, et al. Thromboembolic events among adult
32
33 463 patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General
34
35 464 Practice Research Database. *Haematologica* 2010; 95(7): 1167-75.
36
37 465 10. Norgaard M. Thrombosis in patients with primary chronic immune
38
39 466 thrombocytopenia. *Thromb Res* 2012; 130 Suppl 1: S74-5.
40
41 467 11. Cheng G, Saleh MN, Marcher C, et al. Eltrombopag for management of chronic
42
43 468 immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet*
44
45 469 2011; 377(9763): 393-402.
46
47 470 12. Lakshmanan S, Cuker A. Contemporary management of primary immune
48
49 471 thrombocytopenia in adults. *J Thromb Haemost* 2012; 10(10): 1988-98.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 472 13. Boyle S, White RH, Brunson A, et al. Splenectomy and the incidence of venous
5
6 473 thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2013;
7
8 474 121(23): 4782-90.
9
10 475 14. Kuter DJ, Bussel JB, Newland A, et al. Long-term treatment with romiplostim in
11
12 476 patients with chronic immune thrombocytopenia: safety and efficacy. *Br J Haematol*
13
14 477 2013; 161(3): 411-23.
15
16 478 15. Catala-Lopez F, Corrales I, de la Fuente-Honrubia C, et al. Risk of
17
18 479 thromboembolism with thrombopoietin receptor agonists in adult patients with
19
20 480 thrombocytopenia: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled
21
22 481 trials. *Medicina clinica* 2015; 145(12): 511-9.
23
24 482 16. McCormack PL. Eltrombopag: a review of its use in patients with severe aplastic
25
26 483 anaemia. *Drugs* 2015; 75(5): 525-31.
27
28 484 17. Qureshi K, Patel S, Meillier A. The Use of Thrombopoietin Receptor Agonists for
29
30 485 Correction of Thrombocytopenia prior to Elective Procedures in Chronic Liver Diseases:
31
32 486 Review of Current Evidence. *International journal of hepatology* 2016; 2016: 1802932.
33
34 487 18. Guitton Z, Terriou L, Lega JC, et al. Risk of thrombosis with anti-phospholipid
35
36 488 syndrome in systemic lupus erythematosus treated with thrombopoietin-receptor
37
38 489 agonists. *Rheumatology* 2018.
39
40 490 19. Hayashi S, Oshida M, Kiyoi T, et al. [Reticulated platelet determination:
41
42 491 methodologies and applications for the evaluation of thrombocytopenic disorders].
43
44 492 *Rinsho Ketsueki* 1999; 40(3): 205-12.
45
46 493 20. Lambert MP, Gernsheimer TB. Clinical updates in adult immune
47
48 494 thrombocytopenia. *Blood* 2017; 129(21): 2829-35.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 495 21. Elgebaly AS, Ashal GE, Elfil M, et al. Tolerability and Efficacy of Eltrombopag in
5
6 496 Chronic Immune Thrombocytopenia: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.
7
8 497 Clin Appl Thromb Hemost 2017; 23(8): 928-37.
9
10 498 22. Gonzalez-Porras JR, Mingot-Castellano ME, Andrade MM, et al. Use of
11
12 499 eltrombopag after romiplostim in primary immune thrombocytopenia. Br J Haematol
13
14 500 2015; 169(1): 111-6.
15
16
17 501 23. Saleh MN, Bussel JB, Cheng G, et al. Safety and efficacy of eltrombopag for
18
19 502 treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label
20
21 503 EXTEND study. Blood 2013; 121(3): 537-45.
22
23
24 504 24. Wong RSM, Saleh MN, Khelif A, et al. Safety and efficacy of long-term
25
26 505 treatment of chronic/persistent ITP with eltrombopag: final results of the EXTEND
27
28 506 study. Blood 2017; 130(23): 2527-36.
29
30
31 507 25. Haselboeck J, Kaider A, Pabinger I, et al. Function of eltrombopag-induced
32
33 508 platelets compared to platelets from control patients with immune thrombocytopenia.
34
35 509 Thromb Haemost 2013; 109(4): 676-83.
36
37
38 510 26. Cines DB, Gernsheimer T, Wasser J, et al. Integrated analysis of long-term safety
39
40 511 in patients with chronic immune thrombocytopaenia (ITP) treated with the
41
42 512 thrombopoietin (TPO) receptor agonist romiplostim. International journal of
43
44 513 hematology 2015; 102(3): 259-70.
45
46
47 514 27. Gernsheimer TB, George JN, Aledort LM, et al. Evaluation of bleeding and
48
49 515 thrombotic events during long-term use of romiplostim in patients with chronic
50
51 516 immune thrombocytopenia (ITP). J Thromb Haemost 2010; 8(6): 1372-82.
52
53
54 517 28. Thai LH, Mahevas M, Roudot-Thoraval F, et al. Long-term complications of
55
56 518 splenectomy in adult immune thrombocytopenia. Medicine 2016; 95(48): e5098.
57
58
59
60

- 1
2
3
4 519 29. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, et al. Role of reticulated platelets
5
6 520 and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with
7
8 521 aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll*
9
10 522 *Cardiol* 2008; 52(9): 743-9.
11
12
13 523 30. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, et al. Neutrophil rolling, arrest, and
14
15 524 transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-
16
17 525 selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996; 88(1): 146-57.
18
19
20 526 31. Yanabu M, Nomura S, Fukuroi T, et al. Platelet activation induced by an
21
22 527 antiplatelet autoantibody against CD9 antigen and its inhibition by another
23
24 528 autoantibody in immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1993; 84(4): 694-
25
26 529 701.
27
28
29 530 32. Garabet L, Ghanima W, Monceyron Jonassen C, et al. Effect of thrombopoietin
30
31 531 receptor agonists on markers of coagulation and P-selectin in patients with immune
32
33 532 thrombocytopenia. *Platelets* 2017; 1-7.
34
35
36 533 33. Deng G, Yu S, Li Q, et al. Investigation of platelet apoptosis in adult patients
37
38 534 with chronic immune thrombocytopenia. *Hematology* 2017; 22(3): 155-61.
39
40
41 535 34. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death*
42
43 536 *and differentiation* 2008; 15(2): 243-50.
44
45
46 537 35. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*
47
48 538 2000; 407(6805): 784-8.
49
50
51 539 36. Mitchell WB, Pinheiro MP, Boulad N, et al. Effect of thrombopoietin receptor
52
53 540 agonists on the apoptotic profile of platelets in patients with chronic immune
54
55 541 thrombocytopenia. *Am J Hematol* 2014; 89(12): E228-34.
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 542 37. Goette NP, Glembofsky AC, Lev PR, et al. Platelet Apoptosis in Adult Immune
5
6 543 Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by Auto-
7
8 544 Antibodies. PLoS One 2016; 11(8): e0160563.
9
10 545 38. Fager AM, Wood JP, Bouchard BA, et al. Properties of procoagulant platelets:
11
12 546 defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase.
13
14 547 Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30(12): 2400-7.
15
16 548 39. Lopez JJ, Palazzo A, Chaabane C, et al. Crucial role for endoplasmic reticulum
17
18 549 stress during megakaryocyte maturation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013; 33(12):
19
20 550 2750-8.
21
22 551 40. Lopez E, Berna-Erro A, Lopez JJ, et al. Role of mTOR1 and mTOR2 complexes in
23
24 552 MEG-01 cell physiology. Thromb Haemost 2015; 114(5): 969-81.
25
26 553 41. Booth NA, Robbie LA, Croll AM, et al. Lysis of platelet-rich thrombi: the role of
27
28 554 PAI-1. Annals of the New York Academy of Sciences 1992; 667: 70-80.
29
30 555 42. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, et al. Platelets synthesize large amounts of
31
32 556 active plasminogen activator inhibitor 1. Blood 2004; 104(13): 3943-8.
33
34 557 43. Madoiwa S, Komatsu N, Mimuro J, et al. Developmental expression of
35
36 558 plasminogen activator inhibitor-1 associated with thrombopoietin-dependent
37
38 559 megakaryocytic differentiation. Blood 1999; 94(2): 475-82.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 560
49
50
51 561
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Platelet count, immature platelets and TPO plasma levels. A) Platelet count in the 3 study groups: healthy participants (control), untreated patients with ITP (UT-ITP) and those on treatment with thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA). B) Immature platelets determined by flow cytometry as referred in the Methods section and shown as %. C) Plasma TPO levels. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was considered significant.

Figure 2. Features of clot formation in patients with ITP. Thromboelastography was performed in PRP adjusted to 25×10^9 platelets/L. Detailed procedures and measured parameters are explained in the Methods section. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was considered significant.

Figure 3. Platelet activation markers. Platelets from healthy controls and from patients with ITP (UT-ITP and TPO-RA) in basal condition or stimulated with TRAP were incubated with FITC-PAC1 (A), FITC-anti-P-selectin mAb (B) or FITC-anti-P-CD63 mAb (C) and analyzed by flow cytometry. The data were expressed as % of positive cells. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was considered significant.

Figure 4. Apoptosis signs and prothrombinase complex binding to platelets. PS surface exposure determined by binding of FITC-Annexin V (A), caspase activity (B) and FVa and FXa binding (C) in quiescent platelets from controls and patients with ITP were determined by flow cytometry analysis. Data are expressed as mean fluorescence (MF, A and C) or % of positive cells (B). Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was considered significant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

586 Figure 5. Effect of recombinant TPO and romiplostim on caspase activity in MEG-01
587 cells. MEG-01 cells were treated for 72 h and 1 week without drugs (control) or with
588 TPO (100 ng/mL) or with romiplostim (53 µg/mL). Activated caspases -3,7, -8 and -9
589 were determined by flow cytometry as described in the Methods section. One-way
590 ANOVA and Tukey's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was
591 considered significant

592 Figure 6: PAI-1 levels in plasma, platelets and MEG-01 cells. Plasma levels (A) and
593 platelet content (B) of PAI-1 were measured by ELISA. C: The effect of incubating MEG-
594 01 cells without drugs (control) or with TPO (100 ng/mL) or with romiplostim (53
595 µg/mL) for 72 h and 1 week on PAI-1 expression was tested by Western blot as
596 described in the Methods section. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests
597 were performed, and $p < 0.05$ was considered significant.

599 Table 1-Features of ITP patients without treatment (UT-ITP)

600

No.	Age, years	Sex	Time since diagnosis, years	Previous treatments	Concomitant treatments	Platelet count, (x10 ⁹ /L)
1	23	F	1.6	IVigs	NO	41
2	24	F	7.3	Corticosteroids, IVigs	Ferrous Sulphate	33
3	18	M	1.8	Corticosteroids, IVigs	NO	116
4	92	F	3.0	Corticosteroids, IVigs	Carvedilol	45
5	49	F	3.2	NO	NO	54
6	55	F	17.6	Corticosteroids, IVigs	NO	17
7	80	F	2.2	Corticosteroids, IVigs	Rabeprazole, Carvedilol, Tramadol hydrochloride/Paracetamol, Simvastatin, Glucalazide, Candesartan, Tetrazepam, Ibuprofen, Calcium carbonate, Calcitriol, Bisphosphonates, Iron/sucrose injection	123
8	67	F	4.3	Corticosteroids, IVigs	NO	180
9	69	M	3.6	NO	NO	22
10	75	F	1.2	NO	Hydrochlorothiazide, Irbesartan	38
11	45	F	3.1	NO	NO	158
12	61	F	17.3	Corticosteroids, IVigs	Ranitidine	49
13	56	F	7.3	NO	NO	53
14	62	M	2.5	Corticosteroids, IVigs	NO	170
15	67	M	2.3	NO	NO	47
16	84	M	5.6	NO	NO	130
17	55	M	8.1	NO	NO	175
18	54	F	17.5	Corticosteroids, IVigs	NO	22
19	85	F	18	Corticosteroids, IVigs	NO	68
20	46	F	15.5	Corticosteroids, IVigs	NO	20
21	46	F	14.0	Corticosteroids, IVigs	NO	79
22	23	M	14.7	Corticosteroids, IVigs	NO	28
23	21	M	1.3	Corticosteroids, IVigs	NO	51
24	69	F	16.4	NO	Rifaximin, Levothyroxine, Verapamil, Levocetirizine dihydrochloride, Bromazepam, Atorvastatin, Trimetazidine, Olmesartan medoxomil, Chlortalidone, Thiamine Hydrochloride+ Cyanocobalamin+ Pyridoxine Hydrochloride, Alendronic Acid, Beclometasone dipropionate, Montelukast	32
25	76	F	21.0	NO	NO	37
26	75	F	1.0	NO	Enalapril, Ezetimibe	53
27	26	F	4.1	NO	NO	53
28	40	F	15.9	Corticosteroids, IVigs	NO	243
29	40	F	1.5	NO	NO	139
30	44	F	2.1	NO	NO	89
31	46	F	1.8	Corticosteroids, IVigs	NO	33
32	42	F	1.2	NO	NO	33
33	35	F	5.3	Corticosteroids, IVigs	NO	66
34	36	F	1.7	Corticosteroids	NO	107
35	25	F	4.6	Corticosteroids	Propranolol	50
36	79	M	24.8	Immunosuppressant drugs	NO	109
37	49	M	1.6	NO	NO	95

38	54	F	1.0	NO	NO	68
39	40	F	1.3	Corticosteroids, Azathioprine	Diazepam, Clonazepam	146
40	35	F	8.7	NO	NO	149

Abbreviations: IVigs, intravenous immunoglobulins

Table 2-Features of ITP patients on treatment with TPO-RAs

Nº	Age, years	Sex	Time since diagnosis (years)	Current Treatment (TPO-RA)	Time with current TPO-RA (months)	Previous treatments	SPL (Year)	Concomitant treatments	Platelet count (x 10 ⁹ /L)
1	40	F	9	Eltrombopag 50 mg/d	20	IVigs Corticosteroids	NO	Lamivudine, Abacavir sulfate, Dolutegravir, Fluconazole, Spironolactone	32
2	30	M	20	Eltrombopag 25 mg/d	49	IVigs Corticosteroids	NO	NO	55
3	77	M	25	Romiplostim 8 µg/kg/7 d	44	IVigs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to transaminase increase)	NO	Metformin Ivabradine, Atorvastatin, Pantoprazole	45
4	47	F	6	Eltrombopag 50 mg/d	34	IVigs Corticosteroids	NO	Levothyroxine, Omeprazole	354
5	58	F	37	Romiplostim 10 µg/Kg/7 d	55	IVigs Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	Yes (1984)	Calcium Pidolate/ Cholecalciferol, Lorazepam	30
6	40	M	16	Romiplostim 4 µg/kg/7 d	28	IVigs, Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	Celecoxib, Tramadol hydrochloride/ Paracetamol, Omeprazole	133
7	45	M	9	Romiplostim 1 µg/kg/d	6	IVigs Corticosteroids Rituximab Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	NO	225

8	46	M	10	Romiplostim 1 µg/kg/d	19	IVIGs Corticosteroids Rituximab Eltrombopag (Treatment was suspended due lack of response)	NO	NO	311
9	85	M	18	Romiplostim 10 µg/kg/2 d +IVIGs/2 d	30	IVIGs Corticosteroids	NO	Enalapril	166
10	88	M	21	Eltrombopag 25 mg/d	19	IVIGs, Corticosteroids Romiplostim (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	Enalapril, Darbepoetin alfa	226
11	43	M	41	Romiplostim 1 µg/Kg/7 d	47	IVIGs Corticosteroids Azathioprine Rituximab, Eltrombopag (Treatment was suspended due to loss of response)	Yes (1980)	Pegylated interferon, Ribavirin, Boceprevir	119
12	81	M	5	Prednisone 20 mg + Eltrombopag 25 mg/d	12	IVIGs Corticosteroids Rituximab	NO	Perindopril, Paracetamol	281
13	71	M	14	Eltrombopag 25 mg/d	53	IVIGs Corticosteroids Azathioprine	NO	NO	109
14	72	M	15	Eltrombopag 75 mg/d	68	IVIGs Corticosteroids Dapsone Azathioprine	NO	NO	117
15	73	M	16	Romiplostim 10 µg/kg/7 d + Corticosteroids 10 mg/2 d	8	IVIGs Corticosteroids Dapsone Azathioprine Eltrombopag (Treatment is suspended due to loss of response)	NO	NO	39
16	41	F	13	Eltrombopag 75 mg/d	23	IVIGs Corticosteroids	Yes (2013)	NO	99
17	75	F	12	Eltrombopag 75 mg/d	38	IVIGs Corticosteroids	NO	NO	57
18	76	F	13	Eltrombopag 75 mg/d	49	IVIGs Corticosteroids	NO	NO	40
19	78	M	6	Eltrombopag 25 mg/3 d	2	IVIGs Corticosteroids	NO	Omeprazole, Metformin, Carvedilol, Paroxetine, Digoxin	351

20	75	M	16	Eltrombopag 25 mg/d	30	IVIgs Corticosteroids	NO	Omeprazole, Celecoxib, Silodosin, Paracetamol	86
21	84	M	7	Eltrombopag 25 mg/3 d	15	IVIgs Corticosteroids	NO	Atorvastatin, Pantoprazole, Ferrous Sulphate	97
22	82	F	36	Romiplostim 8 µg/Kg/7 days	39	IVIgs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to hepatic toxicity)	NO	Ferrous Sulphate, Omeprazole, Candesartan , Atorvastatin, Timolol	60
23	18	F	6	Eltrombopag 25 mg/d	2	IVIgs Corticosteroids Romiplostim (Treatment was suspended due to loss of response)	NO	NO	30
24	74	F	3	Romiplostim 2 µg/kg/2 d	2	IVIgs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to hepatic toxicity)	NO	Levothyroxine, Fluoxetine, Tramadol hydrochloride/ Paracetamol, Lorazepam, Omeprazole, Enalapril, Calcifediol, Etoricoxib	116
25	60	F	23	Eltrombopag 25 mg/d	25	IVIgs, Corticosteroids	NO	NO	66
26	61	F	24	Eltrombopag 50 mg/d	40	IVIgs, Corticosteroids	NO	NO	172
27	75	F	3	Eltrombopag 50 mg/d	17	IVIgs Corticosteroids	NO	Diltiazem, Paracetamol, Furosemide, Simvastatin, Allopurinol, Nitroglycerin, Cafinitrina, Lorazepam	260
28	85	F	29	Romiplostim 1 µg/kg/7 d	40	IVIgs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	Calcifediol, Alendronate	93
29	66	F	14	Eltrombopag 50 mg/d	12	IVIgs Corticosteroids Rituximab	NO	Diosmin, Bromazepam, Lorazepam	157

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

30	79	M	1	Eltrombopag 75 mg/d	12	IVigs Corticosteroids	NO	Magnesium	79
31	51	F	6	Eltrombopag 25 mg/d	28	IVig, Corticosteroids	NO	NO	77
32	74	F	1	Romiplostim 6 µg/kg/7 d	7	IVigs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	NO	146
33	62	M	13	Eltrombopag 75 mg/d	1	IVigs Corticosteroids	Yes (2003)	Simvastatin, Allopurinol, Omeprazole, Metformin, Prednisone	110
34	64	M	3	Romiplostim 6 µg/kg/2 d	16	IVigs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	NO	98
35	81	F	5	Eltrombopag 25mg/3 d	11	IVigs Corticosteroids	NO	Enalapril, Atorvastatin	73
36	45	F	3	Eltrombopag 25 mg/ 3 d	17	IVigs Corticosteroids	NO	Atenolol, Ursodeoxycholic acid, Omeprazole	55
37	79	F	13	Eltrombopag 25 mg/d	54	IVigs Corticosteroids Rituximab Romiplostim (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	Omeprazole, Citalopram	260
38	81	M	8	Eltrombopag 50 mg/d	20	IVigs Corticosteroids Rituximab	NO	Perindopril, Paracetamol, Prednisona	281
39	79	F	4	Eltrombopag 25 mg/d	32	IVigs Corticosteroids Rituximab	NO	NO	179

40	59	F	20	Romiplostim 8 µg/kg/7 d	24	IVIgs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	Levothyroxine	57
41	47	F	6	Romiplostim 7 µg/kg/7 d	2	IVIgs Corticosteroids Eltrombopag (Treatment was suspended due to lack of response)	NO	NO	359
42	77	F	14	Eltrombopag 25 mg/2 d	10	IVIgs Corticosteroids Dapsone	Yes (2003)	Olmesartan medoxomil/ Amlodipine, Captopril, Metformin	63

Abbreviation: SPL, splenectomy

Table 3- Biochemical characteristics of patients with ITP

BIOCHEMICAL PARAMETERS (Units, Range of normality)	CONTROL		UT-ITP		TPO-RA	
	% Anomalous results % lower	% higher	% Anomalous results % lower	% higher	% Anomalous results % lower	% higher
C3 (mg/dL, 75-135)	0	10	0	10	1	13
C4 (mg/dL, 14-60)	0	0	10	0	12	0
IgG (mg/dL, 725-1900)	0	0	0	13	2	11
IgM (mg/dL, 45-280)	0	0	0	0	0	7
IgA (mg/dL, 50-340)	0	10	0	8	0	26
LDH (UI/L, 100-190)	0	40	0	33	0	67
CRP (mg/L, 0.00-5.00)	0	10	0	14	0	20

Data are expressed as percentage of patients with anomalous results in each group (percentage below lower limit/percentage above the upper limit).

Table 4-Fibrinolysis-related proteins

	uPA, pg/mL	TAFI, % of activity	tPA, pg/mL
CONTROL	658.2±181.2	32.9±4.9	641.1±425.8
UT-ITP	911.7±309.5	29.4±6.2	665.4±184.6
TPO-RA	620.6±11.03	34.3±7.2	708.7±130.5

Abbreviations: TAFI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; TPO-RA, thrombopoietin receptor agonists; uPA, urokinase-plasminogen activator ; UT-ITP, untreated patients with immune thrombocytopenia.

Data are expressed as mean values ± standard deviation. The ANOVA test was performed and none were significant.

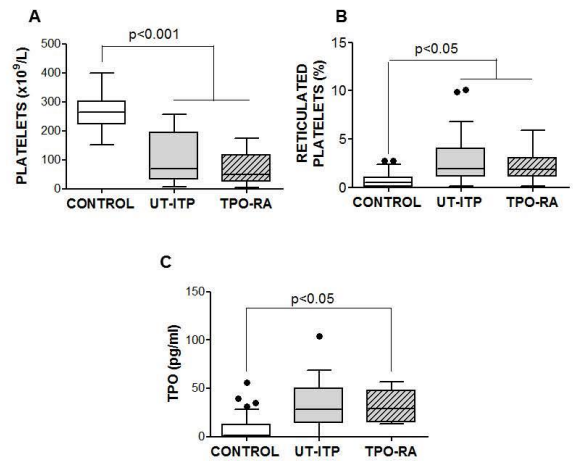


Figure 1. Platelet count, immature platelets and TPO plasma levels. A) Platelet count in the 3 study groups: healthy participants (control), untreated patients with ITP (UT-ITP) and those on treatment with thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA). B) Immature platelets determined by flow cytometry as referred in the Methods section and shown as %. C) Plasma TPO levels. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p<0.05$ was considered significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

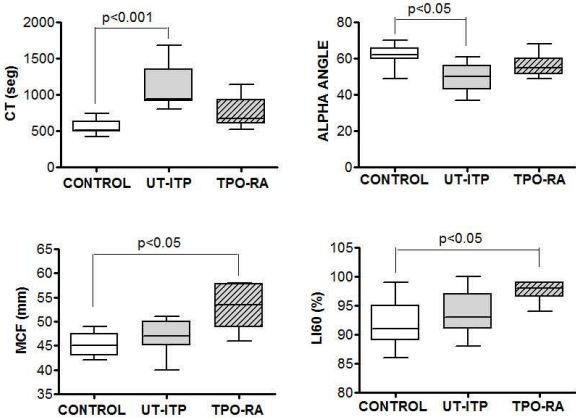


Figure 2. Features of clot formation in patients with ITP. Thromboelastography was performed in PRP adjusted to 25×10^9 platelets/L. Detailed procedures and measured parameters are explained in the Methods section. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was considered significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

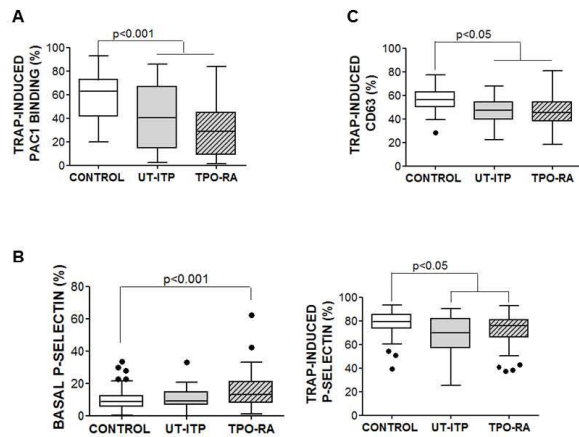


Figure 3. Platelet activation markers. Platelets from healthy controls and from patients with ITP (UT-ITP and TPO-RA) in basal condition or stimulated with TRAP were incubated with FITC-PAC1 (A), FITC-anti-P-selectin mAb (B) or FITC-anti-P-CD63 mAb (C) and analyzed by flow cytometry. The data were expressed as % of positive cells. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p<0.05$ was considered significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

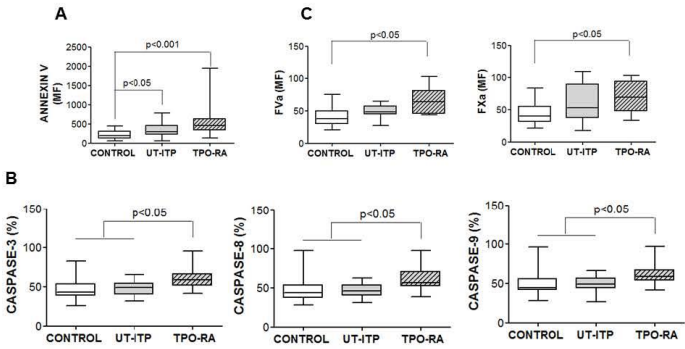


Figure 4. Apoptosis signs and prothrombinase complex binding to platelets. PS surface exposure determined by binding of FITC-Annexin V (A), caspase activity (B) and FVa and FXa binding (C) in quiescent platelets from controls and patients with ITP were determined by flow cytometry analysis. Data are expressed as mean fluorescence (MF, A and C) or % of positive cells (B). Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and $p<0.05$ was considered significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

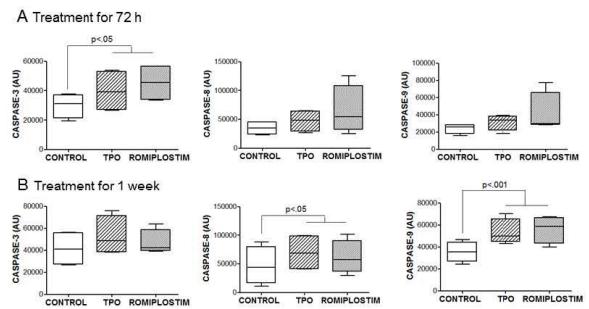


Figure 5. Effect of recombinant TPO and romiplostim on caspase activity in MEG-01 cells. MEG-01 cells were treated for 72 h and 1 week without drugs (control) or with TPO (100 ng/mL) or with romiplostim (53 μ g/mL). Activated caspases -3,7, -8 and -9 were determined by flow cytometry as described in the Methods section. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests were performed, and $p < 0.05$ was considered significant

254x190mm (96 x 96 DPI)

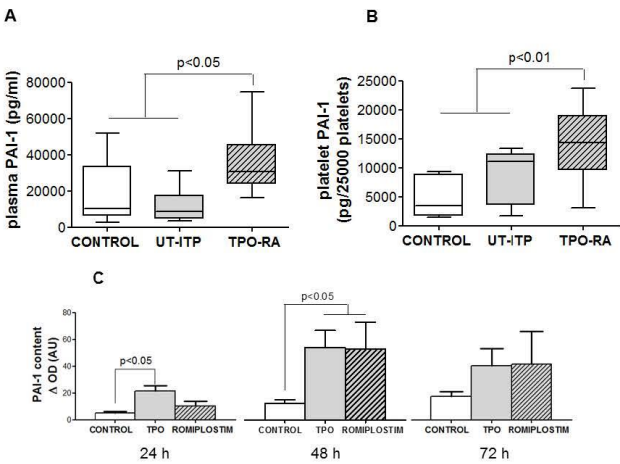


Figure 6: PAI-1 levels in plasma, platelets and MEG-01 cells. Plasma levels (A) and platelet content (B) of PAI-1 were measured by ELISA. C: The effect of incubating MEG-01 cells without drugs (control) or with TPO (100 ng/mL) or with romiplostim (53 ng/mL) for 72 h and 1 week on PAI-1 expression was tested by Western blot as described in the Methods section. Kruskal Wallis and Dunn's multiple comparison tests were performed, and p<0.05 was considered significant.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Factors Involved in Maintaining Haemostasis in Patients with Myelodysplastic Syndrome

Ihosvany Fernández Bello^{1,2} Víctor Jiménez-Yuste^{1,2,3} Raquel de Paz^{1,2} Mónica Martín Salces^{1,2}
 Raul Justo Sanz^{1,2} Elena Monzón Manzano^{1,2} Elena G. Arias-Salgado⁴ María Teresa Álvarez Román^{1,2}
 María Isabel Rivas Pollmar^{1,2} Isabel Goyanes¹ Nora V. Butta^{1,2}

¹ Hematology and Hemotherapy Unit, University Hospital La Paz, Madrid, Spain

² Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPaz), Madrid, Spain

³ Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

⁴ Advanced Medical Projects Madrid, Madrid, Spain

Address for correspondence: Dr. Nora V. Butta, Hematology and Hemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, Paseo de la Castellana 261, Madrid 28046, Spain
 (e-mail: nora.butta@salud.madrid.org).

Thromb Haemost

Abstract

Etiopathogenesis of myelodysplastic syndrome (MDS) might cause per se an anomalous haemostasis that can be even more deteriorated by thrombocytopenia. So, evaluation of haemostasis in patients with MDS rises as a necessity.

This work aimed to characterize haemostasis in non-bleeder MDS patients with a platelet count similar to healthy controls to establish differences between the two groups not related to thrombocytopenia.

Thromboelastometry in samples from MDS patients suggested the existence of at least two antagonistic processes: one of them giving a hypocoagulable pattern (prolonged clotting time and lower α angle) and another conferring a procoagulant profile (decreased fibrinolysis). Hypocoagulable state might be due to a decreased ability of platelets to be stimulated and to the presence in plasma of a factor/s that prolonged the time to initiate thrombin generation. This factor/s might be antibodies as this effect was observed in samples from MDS patients with an associated autoimmune-inflammatory condition.

Otherwise, hypercoagulable state seemed to rely on an increased presence of red cell- and monocyte-derived microparticles and to the increased exposure of phosphatidylserine that served as scaffold for binding of coagulation factors.

We concluded that haemostasis in MDS patients is a complex process influenced by more factors than platelet count.

Keywords

- platelets
- microparticles
- thromboelastometry
- MDS
- prothrombinase complex

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous sort of disorders caused by cytogenetic changes, gene mutations or both¹ responsible for altered multilineage morphological patterns that lead to a varying grade of peripheral blood cytopenias and an increased risk of transformation to acute myeloid leukaemia. This ineffective haematopoiesis is caused by an anomalous relationship between haematopoietic progenitors and bone marrow microenvironment that promotes

the formation and penetrance of a dysplastic clone. It has been recently reported that a great number of immunophenotypic alterations in bone marrow and in peripheral blood cells involve myeloblasts, CD34⁺ B cell and CD34⁺ precursors² and neutrophil, monocytic and erythroid cells.³ Moreover, an increased apoptosis of haematopoietic progenitors that might be due to an immune response against the MDS clone mediated by cytotoxic T cells (CTC) and amplified by CD4⁺ CD25⁺ regulatory (Treg)-Th17 imbalances has been described.⁴

received

August 10, 2017

accepted after revision

January 26, 2018

Copyright © Schattauer

DOI <https://doi.org/>

10.1055/s-0038-1637733.

ISSN 0340-6245.

It is widely accepted that subjects with platelet counts higher than 50,000/ μ L hardly bleed and that major haemorrhage is more likely at platelet counts below 10,000/ μ L. Nevertheless, some patients with severe thrombocytopenia do not suffer from spontaneous bleeding. Thrombocytopenia is observed in approximately 35% of MDS patients. We have recently reported that platelets from MDS patients had a diminished ability to be activated even in patients with normal or elevated platelet counts possibly due to the exacerbated platelet apoptosis observed.⁵ In spite of this, it is estimated that less than 10% of MDS patients initially present serious haemorrhagic complications⁶ and that only 9.8% of deaths in these patients were related to bleeding.⁷ The precise platelet levels at which MDS patients become at risk of bleeding have not been well defined.⁸ So, haemostasis in MDS patients is a complex issue where mechanisms additional to platelet count/function seem to be involved. This scenario turns even more complicated by comorbidities suffered by this mostly elder population and by therapeutic approaches used for MDS management. So, evaluation of haemostasis in MDS patients rises as a necessity.

This work aimed to characterize haemostasis in non-bleeder MDS patients with a platelet count similar to healthy controls to establish differences between the two groups not related to thrombocytopenia. Recently, rotational thromboelastometry (ROTEM) emerged as a valuable tool to evaluate haemostasis in many pathological situations such as liver disease⁹ and immune thrombocytopenia (ITP).¹⁰ So, ROTEM was employed to test haemostasis in our cohort of MDS patients.

Methods

Patients and Study Design

This is a prospective, observational and transversal study. Eighty-four non-bleeder MDS patients (44% female, age [mean \pm SD] of 77 \pm 25 years), whose features are described in **Table 1**, were included. Sixty healthy individuals (45% female, age [mean \pm SD] of 57 \pm 22 years) were recruited in the Blood Donor Section of the Hematology Unit of La Paz University Hospital.

Patients with uncontrolled hypertension, hyperlipidaemia, peripheral or coronary artery disease, abnormal hepatic or renal function tests or on treatment with platelet active drugs, lenalidomide, hydroxycarbamide, azacitidine or those who had received a transfusion within 15 days of the study were excluded.

The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the experimental protocol. The research was performed in compliance with the Helsinki Declaration and after receiving signed patient-informed consent.

Preparation of Platelet-Rich Plasma and Washed Platelets

Human peripheral blood samples were collected in 3.8% sodium citrate. Blood cell counts were performed with a Coulter Ac.T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

Table 1 Clinical features and therapies of MDS patients

WHO Classification	RARS	19 (22.5%)
	RAEB-1	5 (6.0%)
	RAEB-2	5 (6.0%)
	RCMD	36 (42.9%)
	RCUD	11 (13.1%)
	CMML	8 (9.5%)
IPSS	Low	56 (66.7%)
	Intermediate-1	26 (31%)
	Intermediate-2	1 (1.1%)
	High	1 (1.1%)
Cytopenias	None	4 (4.8%)
	One	53 (63.1%)
	Two	26 (31.0%)
	Three	1 (1.1%)
Cytogenetic abnormalities	46,XY[20]	30 (35.7%)
	46,XX[20]	27 (32.1%)
	del(5q)	6 (7.1%)
	del(20q)	2 (2.4%)
	46,XY del(5)(q21q33)[17]	2 (2.4%)
	46,XX,del(20)(q12)	2 (2.4%)
	46,XX,i(14)(q10) [9]	1 (1.2%)
	46,XX (11q23)	1 (1.2%)
	47,XX, + 21	1 (1.2%)
	47,XY, + 8	1 (1.2%)
	47,XX, + 8 [9] 47,XX, + 8,i(17)(q10) [9]	1 (1.2%)
	46,XY,-18, + r(?) [21]	9 (10.7%)
	46,XX,add(3)(q29)	1 (1.2%)
AIC	Rheumatic polymyalgia	1 (1.2%)
	Psoriasis	2 (2.4%)
	Rheumatoid arthritis	6 (7.1%)
	Vasculitis	1 (1.2%)
	IgA-nephropathy	1 (1.2%)
	Pigmented purpuric dermatoses	1 (1.2%)
	Hypothyroidism	3 (3.6%)
	ASCA	1 (1.2%)
	ANA antibodies	2 (2.4%)
	ANCA	1 (1.2%)
	CRP	18 (21.4%)
	Rheumatoid factor	8 (9.5%)

(Continued)

Table 1 (Continued)

Treatment	Dried ferrous sulfate	1 (1.2%)
	Folic acid	6 (7.1%)
	None	45 (53.6%)
	Deferasirox	7 (8.3%)
	Erythropoietin	25 (29.8%)
	G-CSF	1 (1.2%)

Abbreviations: 5q SD, 5q-syndrome; AIC, autoimmune-inflammatory accompanying condition; ANA, antinuclear antibodies; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; ASCA, anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; CRP, C-reactive protein; IPSS, International Prognostic Scoring System; RA, refractory anaemia; RAEB-1, refractory anaemia with excess blast type 1; RAEB-2, refractory anaemia with excess blast type 2; RARS, refractory anaemia with ringed sideroblasts; RCMD, refractory cytopaenia with multilineage dysplasia; RCUD, refractory cytopaenia with uni-lineage dysplasia; WHO, World Health Organization.

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of whole blood (150 g for 20 minutes at 23°C). To obtain washed platelets, the top two-thirds volumes of PRP were collected and centrifuged (650 g for 10 minutes at 23°C) after the addition of acid-citrate-dextrose (ACD, 1:10). The pellet was resuspended in an equal volume of HEPES buffer (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl and 1 mM MgSO₄, pH 7.4).

Platelet-poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation at 1,500 g for 15 minutes at 23°C. Platelet-free plasma (PFP) was obtained by two additional centrifugations (first: 15 minutes at 1,500 g; second: 2 minutes at 13,000 g). PPP and PFP aliquots were stored at -80°C until analysis.

All the samples were analysed or stored properly within 2 hours of sampling as recommended to avoid significant artefacts in platelet analysis¹¹ and the release of cell micro-particles (MPs) due to storage.¹²

Determination of Platelet Activation

Platelet-rich plasma was diluted 1:5 with HEPES buffer and incubated with 100 µmol/L thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland) at room temperature (RT). Following incubation, fluorescein-isothiocyanate (FITC)-PAC1 (BD, Madrid, Spain), a monoclonal antibody (mAb) that recognizes activated conformation of fibrinogen receptor or FITC-labelled antihuman P-selectin mAb (BD Pharmingen, San Diego, California, United States) was added for 15 minutes at RT. After incubation, platelets were diluted in HEPES buffer for flow cytometry analysis with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Madrid, Spain).

Calibrated Automated Thrombogram

Thrombin generation was measured in PPP by calibrated automated thrombogram (CAT) as described previously.¹³ Coagulation was triggered by proper recalcification and the addition (final concentrations) of 1 pmol/L of recombinant human tissue factor and 4 µmol/L of phospholipid mixture (PPP-Reagent LOW, Thromboscope BV, Maastricht, the

Netherlands). Lag time (LT = time when 10 nmol/L thrombin is formed); time-to-peak (TTP = time to reach the maximum thrombin concentration); peak height (PH = maximum thrombin concentration reached) and endogenous thrombin potential (ETP = area under the thrombin-concentration vs. time curve) were calculated with the Thromboscope software package (Thromboscope BV).

The effect of plasma from patients with MDS on thrombin generation of healthy control platelets was tested. To do so, washed platelets were resuspended in HEPES buffer, pooled and divided in aliquots containing 25×10^6 platelets which were additionally centrifuged (650 g for 3 minutes) after adding ACD 1:10. Platelet pellet was resuspended in 1 mL of PPP from the controls or the patients with MDS. Coagulation was triggered by platelet stimulation with 100 µmol/L TRAP.

Rotational Thromboelastometry

Kinetics of clot formation and fibrinolysis was evaluated with a viscoelastometric clotting test (ROTEM; Pentapharm, Munich, Germany).

ROTEM was performed on fresh PRP adjusted to 25×10^9 platelets/L with PFP from own subject. The samples were allowed to rest at RT for 30 minutes before testing. Only recalcification (NATEM test) was performed to assess the kinetics of clot formation. Clotting time (CT = time from start of measurement until initiation of clotting, in seconds); clot formation time (CFT = time from initiation of clotting to 20 mm amplitude, in seconds, which reflects the speed of the clotting process); α angle (tangent to the curve at 20 mm amplitude, in degrees, which reflects the rate of fibrin polymerization); amplitude at 'x' time (Ax, in mm); maximum clot firmness (MCF = maximum clot firmness, in mm, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus) and lysis at 60 minutes (LI60) were recorded.

Determination of Cellular Origin and Procoagulant Activity of Microparticles

Phosphatidylserine (PS)-associated and tissue factor (TF)-associated procoagulant activity of MPs was determined with the ZYMUPHEN MP-Activity kits (HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, France).

The identification of the MP's cellular origin was determined by flow cytometry, labelling MPs with FITC-Annexin-V and the following specific mAb conjugated with phycoerythrin: anti-CD41 mAb for platelets (Biocytex; Marseille, France); and anti-CD14 mAb for monocytes, anti-CD144 mAb for endothelial cells, anti-CD235 mAb for red cells and anti-CD45 mAb for leukocytes, all from BD Biosciences.

Measurement of Phosphatidylserine Exposure on Platelet Surfaces and Caspases Activities

Surface exposure of PS in washed platelets was assessed by measuring the binding of FITC-labelled Annexin V (BD Pharmingen). Briefly, washed platelets were resuspended in Annexin V binding buffer (10 mM Hepes, 10 mM NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4) and labelled with FITC-Annexin V. After incubation for 15 minutes at RT in the dark, samples were analysed by flow cytometry.

To analyse active caspase-3, -8 or -9, PRP was diluted 10-fold with isotonic HEPES-buffered saline with Ca^{2+} (150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM Gly-Pro-Arg-Pro [SIGMA; Madrid, Spain], 2 mM HEPES, pH 7.4), containing the PE-labelled mAb to $\alpha 2b$, and either FAM-DEVD-FMK, FAM-LETD-FMK or FAM-LEHD-FMK (Millipore; Madrid, Spain).

Prothrombinase Complex Binding to Platelets

Either quiescent or 100 μM TRAP stimulated washed platelets ($1 \times 10^8/\text{mL}$) were incubated with factor (F) Xa (5 nmol/L) and FVa (5 nmol/L) obtained from Haemtech Inc (Cellsystems, Germany). Following fixation to cross-link platelet-bound FVa and FXa, specific or control monoclonal antibodies (0.1 $\mu\text{mol/L}$ each; Haemtech Inc, Germany) were added. After washing, FITC-conjugated polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulin (DAKO, Spain) was added. An aliquot was incubated with phycoerythrin (PE)-mAb against the αIIb subunit (Biocytex; Marseille, France). All samples were analysed by flow cytometry.

Analytical Determinations in Platelet-Poor Plasma

Fibrinogen (FG) was determined by the Clauss method (ACL TOP 700; Beckman Coulter), FVIII by chromogenic assays and FVII, FIX and FXI by clotting assays (BCS XP system [Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany]). All these substances were determined in PPP samples.

The human urokinase-plasminogen activator (uPA) kit used was from R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, United Kingdom); the tissue plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) kits were obtained from eBioscience (Hatfield, United Kingdom); and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activity was from American Diagnostica (Pfungstadt, Germany). All these substances were determined in PPP samples, following the manufacturer's instructions and measured in Multiskan FC with incubator (ThermoScientific; Madrid, Spain).

Statistics

The statistical analysis of the experimental data was performed using SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, United States). The Shapiro-Wilk test was used to test normal distribution. For comparison of multiple groups, a non-parametric one-way ANOVA using Dunn's multiple comparison post-hoc test was performed. Comparison of the media of two groups was performed using the Student 't'-test or Mann-Whitney U-test, and the correlations were calculated with Pearson's or Spearman's tests, depending on the sample distribution. All tests were two-tailed and level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Features of Myelodysplastic Syndrome Patients

The mean age of the control group was lower than the mean age of patients with MDS because of the difficulty in obtaining samples from older donors.

To validate our cohort of healthy donors (most of them younger than 65 years), we recruited a group of 16 donors

elder than 65 years (most of them accompanying wives or husbands of MDS patients). We analysed by flow cytometry features of their platelets (activation ability, PS exposure) and clot formation kinetics (ROTEM) and compared these results with those obtained in healthy donors younger than 65 years (those recruited in the Blood Donor Section) and we found no significant differences between groups. So, we considered that mean age difference between healthy controls and MDS patients did not bias our results.

Significant differences were observed between controls and MDS patients in red cell counts (controls: $4.2 \pm 0.4 \times 10^6/\mu\text{L}$; MDS patients: $3.1 \pm 0.7 \times 10^6/\mu\text{L}$, $p < 0.0001$), haemoglobin (controls: 13.1 ± 1.4 g/dL; MDS patients: 10.2 ± 2.0 , $p < 0.0001$) and monocytes (controls: $6.9 \pm 2.1\%$; MDS patients: $13.8 \pm 2.5\%$, $p < 0.005$), whereas no differences were found in platelet counts (controls: $187 \pm 50 \times 10^3/\mu\text{L}$; MDS patients: $149 \pm 710^3/\mu\text{L}$, $p = 0.34$) and leukocytes (controls: $5.5 \pm 1.3 \times 10^3/\mu\text{L}$; MDS patients: $5.7 \pm 3.2 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p = 0.12$). Twenty-nine percent of MDS patients needed red cells transfusional support.

Global Haemostasis in Patients with Myelodysplastic Syndrome

ROTEM studies were performed with fresh PRP samples to evaluate global haemostasis in MDS patients. **Fig. 1** shows a delay in clot formation in the MDS group, as indicated by a prolonged CT (control: 516 ± 93 seconds; MDS: 946 ± 217 seconds, $p < 0.001$), a diminished α angle (control: 62.5 ± 3.3 ; MDS: 47.4 ± 8.4 , $p < 0.0001$) and clot firmness assessed as amplitude at 5 minutes (A5, control: 29.1 ± 3.1 ; MDS: 23.6 ± 5.1 , $p < 0.0001$). This observation was not due to a diminished content of fibrinogen (294 ± 22 mg/dL) or of clotting factors (FVII: $105 \pm 48\%$; FVIII: 195 ± 21 ; FIX: $111 \pm 17\%$ and FXII: $102 \pm 21\%$). Finally, samples from MDS patients reached the same MCF as in control group. Surprisingly, a reduced clot lysis after 60 minutes (LY60 control: $88.6 \pm 3.0\%$; MDS: $95.6 \pm 3.1\%$, $p < 0.001$) was observed in MDS samples. This effect was not due to a misbalance in proteins involved in fibrinolysis (**Table 2**).

To test platelet function in our MDS cohort, platelets were activated with TRAP and binding of PAC1 and exposure of P-selectin was tested. As shown in **Fig. 2**, both of them were reduced emphasizing platelet-hampered ability to be activated. Moreover, the worst pathological situation was accompanied by the less ability of fibrinogen receptor to be stimulated.

Apoptosis in Platelets from Myelodysplastic Syndrome Patients

Platelets from patients with MDS presented higher levels of activated caspases-3, -7, -8 and -9 (**Fig. 3**) and this situation was accompanied by a higher PS platelet surface exposure (**Fig. 4A**).

Prothrombinase Complex Binding to Quiescent and Activated Platelets

We evaluated if PS was functional for anchoring prothrombinase complex. Binding of FVa and FXa on platelet membrane surface was higher in quiescent platelets from MDS

Haemostasis in Myelodysplastic Syndrome Fernández Bello et al.

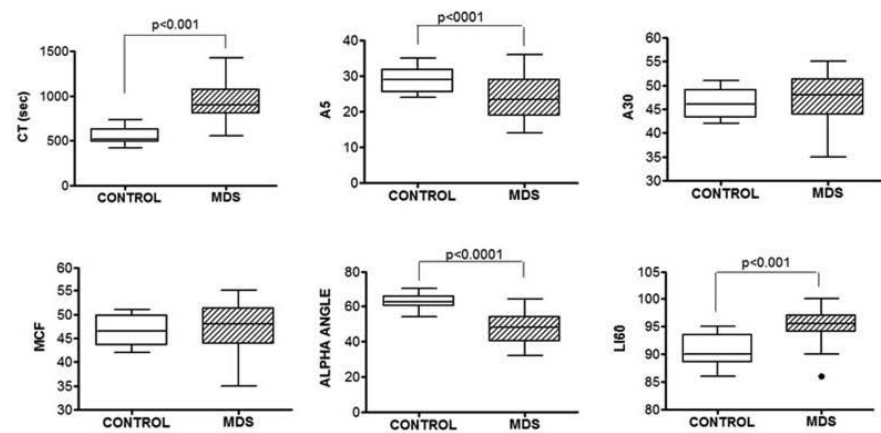


Fig. 1 Features of clot formation in patients with MDS. ROTEM thromboelastography was performed in PRP adjusted to 25×10^3 platelets/ μ L. Detailed procedures and measured parameters are explained in section 'Methods'. The Mann-Whitney U-test was performed and $p < 0.05$ was considered significant. MDS, myelodysplastic syndrome; PRP, plasma-rich protein.

Table 2 Fibrinolysis-related proteins

	Control	MDS
TAFI	36.0 \pm 4.9% of activity	29.4 \pm 6.4% of activity
uPA	658.2 \pm 181 pg/mL	737.5 \pm 326.1 pg/mL
tPA	641.0 \pm 421 pg/mL	622 \pm 329.1 pg/mL
PAI-1	12.9 \pm 10.0 ng/mL	11.5 \pm 13.2 g/mL

Abbreviations: MDS, myelodysplastic syndrome; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TAFI, thrombin activable fibrinolysis inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase-plasminogen activator. Notes: Data are expressed as mean values \pm standard deviation. The 't' test was performed and none were significant.

patients as shown in ~Fig. 4B. After TRAP stimulation, PS exposure increased in both groups, being this increment higher in controls (~Fig. 4A). Prothrombinase binding was enhanced after TRAP stimulation and in this situation, no differences were observed between platelets from healthy controls and MDS patients.

Microparticles in Plasma from Patients with Myelodysplastic Syndrome

To determine the cellular source of MPs, flow cytometry analyses were performed and a significant increase was observed in the total amount of MPs due to the increase in monocyte- and red cell-derived MPs in the samples from the patients with MDS (~Fig. 5).

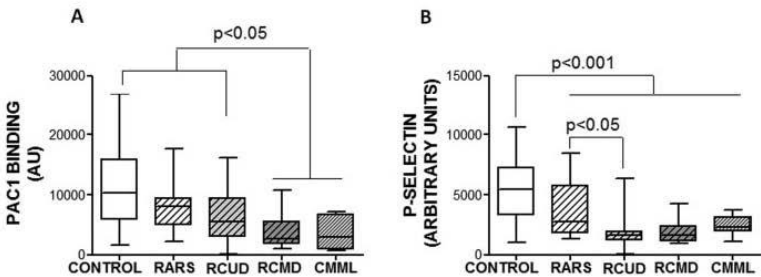


Fig. 2 TRAP-induced activation of fibrinogen receptor and surface expression of P-selectin. Platelets from healthy controls and from MDS patients were stimulated with 100 μ M TRAP and then binding of FITC-PAC1 (A) and FITC anti-P-selectin mAb (B) was assayed and evaluated by flow cytometry. Data are expressed as arbitrary units (mean fluorescence X % of positive cells). Mann-Whitney U comparison test was performed and $p < 0.05$ was considered significant. FITC, fluorescein-isothiocyanate; MDS, myelodysplastic syndrome.

Thrombosis and Haemostasis

Downloaded by University of Connecticut. Copyrighted material.

Haemostasis in Myelodysplastic Syndrome Fernández Bello et al.

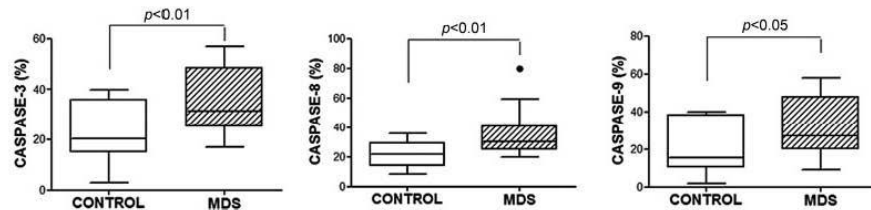


Fig. 3 Platelet-activated caspases -3, -7, -8 and -9 were determined by flow cytometry as described in section 'Methods'. Mann-Whitney U comparison test was performed and $p < 0.05$ was considered significant.

Procoagulant activity of MPs associated with either PS or TF was higher in chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) patients (~Fig. 6).

In the patients with MDS, TF-MP-associated thrombogenic ability correlated with monocyte percentage (Spearman's $r = 0.5019$, $p < 0.01$).

Plasma Coagulant Capacity

Plasma procoagulant activity evaluated by CAT did not show differences between controls and MDS patients in any of the measured parameters: lag time (control: 4.8 ± 3.6 minutes; MDS: 6.3 ± 4 minutes, $p = 0.07$), peak (control: 248.8 ± 59.1 nmol/L; MDS: 227.4 ± 52.1 nmol/L, $p = 0.87$) and ETP (control: $1,455.8 \pm 333.0$ nmol/L \times min; MDS: $1,243.4 \pm 256$ nmol/L \times min, $p = 0.25$).

Since platelets have a key role in blood coagulation, their inclusion in CAT experiments seems to give a more detailed picture of the procoagulant ability than PPP. Considering that

a plasma factor might be responsible for the delay in clot formation observed in ROTEM test, the effect of plasma from MDS patients and from controls on the procoagulant capacity of platelets from healthy controls was tested. Under this experimental condition, PPP from the patients with MDS, compared with the PPP from healthy subjects, prolonged lag time for thrombin generation (control: 10.6 ± 2.7 minutes; MDS: 13.3 ± 2.2 minutes, $p < 0.05$), diminished peak (control: 233.7 ± 93.7 nmol/L; MDS: 122.7 ± 54.7 nmol/L, $p < 0.005$) and ETP (control: $1,744.8 \pm 376.9$ nmol/L \times min; MDS: $1,276.4 \pm 280$ nmol/L \times min, $p < 0.001$). All these parameters correlated with ROTEM CT (lag time: Pearson's $r = 0.8833$, $p < 0.001$; peak: Pearson's $r = 0.8300$, $p < 0.001$ and ETP: Pearson's $r = 0.8350$, $p < 0.005$). As previously mentioned, plasma from the patients with MDS possessed normal levels of fibrinogen and clotting factors, so this might not be the cause of the reduced procoagulant profile.

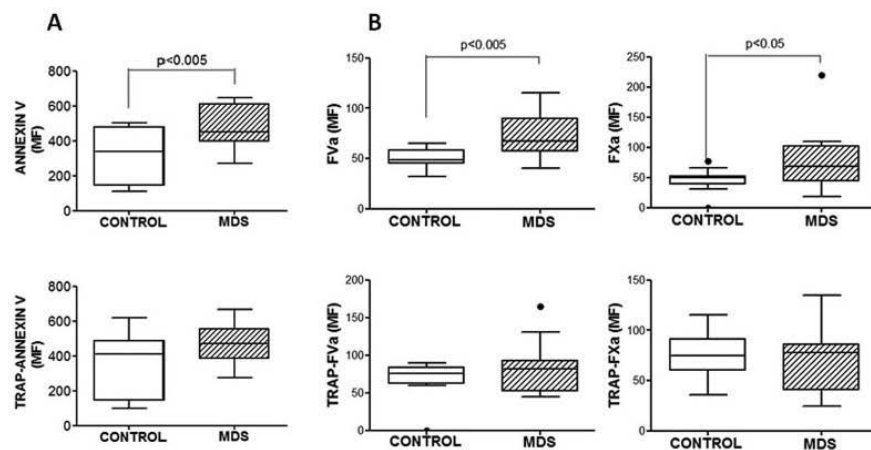


Fig. 4 PS surface exposure and prothrombinase complex binding to platelets from MDS patients. PS surface exposure determined by binding of FITC-Annexin V (A) and FVa and FXa binding (B) in either quiescent or $100 \mu\text{M}$ -TRAP stimulated platelets from controls and MDS patients was determined by flow cytometry analysis. Data are expressed as MFps. The Mann-Whitney U-test was performed and $p < 0.05$ was considered significant. FITC, fluorescein-isothiocyanate; MDS, myelodysplastic syndrome, MF, mean fluorescence; PS, phosphatidylserine.

Thrombosis and Haemostasis

Haemostasis in Myelodysplastic Syndrome Fernández Bello et al.

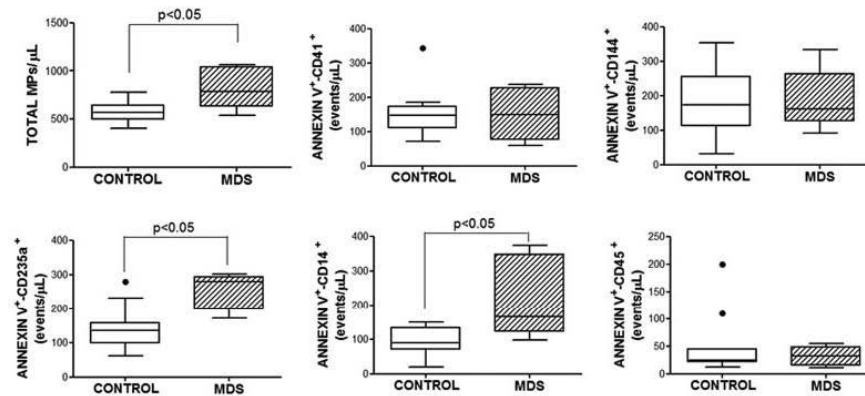


Fig. 5 Analysis of cellular origin of MPs. MPs were labelled with FITC-Annexin V and a PE-labelled antibody specific for a cellular type. Samples were analysed by flow cytometry. The Mann-Whitney U-test was performed and $p < 0.05$ was considered significant. FITC, fluorescein-isothiocyanate; MP, microparticle; PE, phycoerythrin.

The effect of plasma from MDS patients on thrombin generation in the presence of control platelets was similar to that observed with plasma from patients with lupus anticoagulant antibodies. Since approximately 45% of patients from our cohort have an autoimmune-inflammatory accompanying condition (AIC), we analysed our results stratifying population in MDS without/with AIC. As observed in ~Fig. 7, the presence of AIC seems to hamper thrombin generation in MDS patients.

Discussion

Analyses of the ROTEM parameters of our cohort of MDS patients suggested the existence of at least two antagonistic processes: one of them giving a hypocoagulable pattern (prolonged CT and lower α angle) and another conferring a procoagulant profile (decreased fibrinolysis).

Retarded haemostasis may rely on platelet count and/or function.^{14,15} First of these possibilities can be ruled out as

experiments were performed in PRP samples adjusted to the same platelet count. Moreover, extra factors that might exist in samples from thrombocytopenic subjects¹⁶ can also be discarded because whole blood from healthy controls and MDS patients had similar platelet count. On the contrary, platelet function seems to be involved because it is hindered (present results and the results of Martín et al⁵). A platelet-reduced ability to be stimulated was also reported by other laboratories.^{17,18} In further support of this observation, analyses of platelet's proteome from MDS patients showed a significant reduction in expression of proteins that play critical roles in fibrinogen receptor signaling and thus platelet spreading and aggregation.¹⁹ Diminished capacity of platelets from MDS patients to be stimulated was not an artefact due to the difference in mean age between MDS and healthy control groups since we validated control group and previous works indicated a moderate increase in platelet reactivity with age,^{20,21} the opposite of observed in MDS patients.

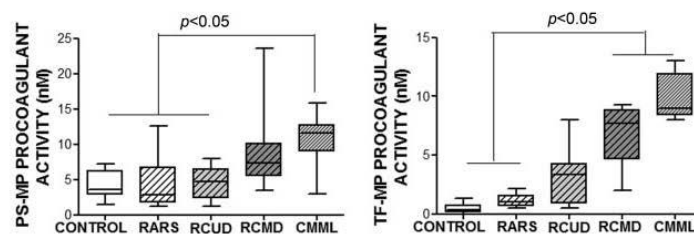


Fig. 6 MP-associated procoagulant capacity in MDS patients. PS- and TF-MP-associated procoagulant activity was determined with ZYMUPHEN MP-Activity kits. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison tests were performed and $p < 0.05$ was considered significant. MDS, myelodysplastic syndrome; MP, microparticle.

Thrombosis and Haemostasis

Haemostasis in Myelodysplastic Syndrome Fernández Bello et al.

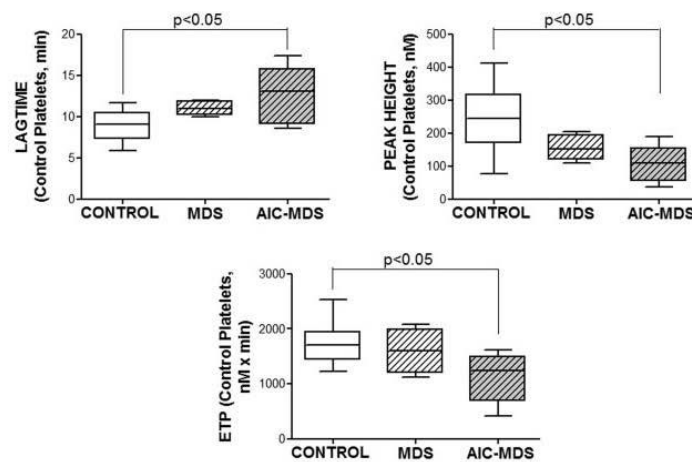


Fig. 7 Effect of plasma from MDS patients on thrombin generation in presence of control platelets. MDS patients were divided into two groups depending on the absence or presence of AICs. Washed control platelets were resuspended and adjusted to 25×10^3 platelets/ μ L with PPP from controls or patients with MDS or AICs-MDS. Coagulation was triggered by stimulation with 100 μ mol/L TRAP. One-way ANOVA and Dunn's multiple comparison tests were performed and $p < 0.05$ was considered significant. MDS, myelodysplastic syndrome.

Impairment of platelet function might be related to increased apoptosis observed in platelets from MDS patients (present results and the results of Martín et al⁵). A similar relationship between platelet apoptosis and function was described for busulfan-treated platelets, which displayed an increased expression of Bax and caspase 3 activity in a dose-dependent manner and presented a reduced collagen- and ADP-induced platelet aggregation.²²

Platelet's surface membrane almost exclusively exposes choline phospholipids and sphingomyelin, whereas the inner leaflet possesses the majority of the amine-containing phospholipids (PS and phosphatidylethanolamine²³). Membrane phospholipid asymmetry is disrupted by either activation or apoptosis, despite both processes are mediated by different intracellular mechanisms.²⁴ In MDS patients, increased PS membrane exposure observed even in quiescent conditions seemed to be related to apoptosis and not activation.⁵ PS exposed at the surface of platelets provides a negatively charged scaffold for the binding of calcium-dependent coagulation enzymatic complexes and provides a catalytic surface for the tenase and/or prothrombinase complexes that promote thrombin generation.²⁵ One of the goals of this work was to demonstrate that MDS platelets were able to bind more prothrombinase complex in basal conditions and a similar amount than platelets from healthy controls after being stimulated. This last observation might be explained because MDS platelets were refractory to being stimulated; so, after TRAP activation, PS exposure was similar in both groups. These procoagulant platelets mount and sustain a procoagulant response; thus, they are proposed to play a significant role in regulating both normal haemostasis and pathological thrombus formation.²⁶

Another process triggered by either cellular activation or apoptosis is the release of MPs, exocytic products derived from plasma membrane. The haemostatic and/or thrombotic function(s) of MPs may be related to their surface exposure of PS which allows for docking prothrombinase complex²⁵ and the presence of specific receptors²⁷ and cytosolic proteins as well as genetic information in the form of messenger RNA (mRNA) and microRNA from their parental cells.²⁸ In this study, we observed an increased procoagulant activity associated with PS as well as TF content of MPs. In our cohort of MDS patients, augmented MPs came from red cells and monocytes.

Monocytes, as well as their released MPs, are rich TF containing elements. TF is the transmembrane receptor for factor (F) VII/VIIa and is proposed to be the principal initiator of coagulation *in vivo*²⁹ and TF-MPs are considered the main reservoir of plasma TF activity.³⁰ Monocyte MPs may contribute to confer a procoagulant feature to MDS patients that might protect them for bleeding. It has been reported that fibrin formation is the result of TF activity from MPs and that the accumulation of fibrin in its network formation increases its resistance to fibrinolysis.^{31,32} According to our results, TF-MPs increment, and no variations in levels of proteins involved in fibrinolysis, might explain the resistance to fibrinolysis observed in MDS patients. TF-positive MPs were proposed to contribute to thrombosis in a variety of diseases including acute myocardial infarction,³³ sickle cell disease,³⁴ endotoxaemia³⁵ and cancer.³⁶ Moreover, the observation that CMML patients presented the highest procoagulant activity associated with TF-MPs is in accordance with the increased count of monocytes observed in these patients.³⁷

Increased MPs from red cells might also favour a procoagulant profile in MDS patients since they initiate thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation, apparently, by a mechanism completely independent of TF.³⁸ In support of this, the hypercoagulable state in patients suffering from sickle cell disease is associated with increased levels of circulating red cell MPs,³⁹ and, consistently, haemolysates containing red cell MPs, augmented thrombin generation.⁴⁰

Despite we did not find differences in platelet-derived MPs between MDS patients and controls, when results were related to the platelet count, subjects with MDS had higher platelet-derived MPs/platelets ratio. Similar results were reported by Connor et al⁴¹ reflecting an increased number of MPs released by each platelet.

It is not uncommon for patients with MDS to present autoimmune and inflammatory conditions (AICs) that can appear before, during or after this disease diagnosis.⁴² Constitutively activated innate immune and inflammatory pathways may be responsible of AICs. AICs could arise from cellular stresses associated with immunologic senescence of the aged MDS population or to genomic instability and other genetic and epigenetic abnormalities that occur in haematopoietic cells due to abnormal cellular interactions in the BM microenvironment.^{43,44}

We observed that nearly the 40% of the MDS patients included in our cohort presented immunological (anti-neutrophil, anti-nuclear and anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies) or/and serological (increased rheumatoid factor and C-reactive protein) abnormalities or an autoimmune disease. Similar immunological abnormalities were reported in studies performed on Asian⁴⁵ and European MDS populations.⁴⁶

Whether the hampered effect of plasma on control platelets in the thrombin generation experiments may be related to antibodies against platelets is an issue that deserves more studies. In support of the possibility of the existence of this kind of antibodies, it has been reported that some MDS patients with thrombocytopenia had a recovery of their platelet count after splenectomy.⁴⁷

Our work shows that haemostasis in MDS patients is a complex process influenced by multiple factors affected by disease etiopathogenesis, comorbidities accompanying elderly patients. Moreover, many drugs used for MDS treatment modify platelet count. Azacitidine doubles platelet count in patients with thrombocytopenia and with normal platelet in all cytogenetic risk groups, in patients with and without circulating blasts, and in patients who were transfusion dependent and independent.⁴⁸ Decitabine shows an increased platelet count within two cycles in most MDS patients,⁴⁹ whereas lenalidomide's main side effect is thrombocytopenia grade 3 or grade 4.⁵⁰ We recommend a close follow-up of haemostatic state in MDS patients before and during drug therapy to avoid either haemorrhagic or thrombotic complications. Thromboelastography with the ROTEM system maybe a valuable tool for studying haemostasis because it provides real-time analysis of the viscoelastic properties of clot formation and dissolution.

Thrombosis and Haemostasis

What is known about this topic?

- MDS patients, even those with normal platelet count, have a reduced platelet function due to enhanced apoptosis but do not bleed in many cases, suggesting the presence of additional mechanisms different from platelet count/function that participate in controlling their haemostasis.
- Several drugs used for MDS treatment modify platelet count, with probable effects on haemostasis.

What does this paper add?

- This work evaluated global haemostasis in MDS patients showing the existence of two antagonistic processes: one of them gives a hypocoagulable pattern and another confers a procoagulant profile.
- Hypocoagulability might rely on impaired capacity of platelets from MDS to be activated.
- Procoagulant profile seemed to be related to a decreased fibrinolysis and to the increase in tissue factor-containing microparticles and in the binding of prothrombinase complex to platelets which, due to the enhanced apoptosis, exposed more phosphatidylserine.
- Evaluation of haemostasis during therapeutic treatments of MDS arises as a recommended tool to avoid the occurrence of adverse haemostatic events.

Note

This work was supported by grants from the FIS-FONDOS FEDER (PI15/01457, N.V.B.). NVB holds a Miguel Servet II tenure track grant from FIS-FONDOS FEDER (CP14/00024).

Authors' Contribution

I.F.B., R.J.S., E.M.M. and E.G.A-S. performed the experiments. R.d.P., M.T.A.R., M.M.S., M.I.R.P. and V.J.-Y. diagnosed and provided clinical care to MDS patients. I.G. collected and verified patient information. I.F.B., R.d.P., V. J.-Y. and N.V.B. analysed the results. N.V.B. was the principal investigator, designed the experiments and wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

Conflict of Interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to thank the skilful collaboration of nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Hematology Unit of La Paz University Hospital.

References

- 1 Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011;364 (26):2496–2506

Haemostasis in Myelodysplastic Syndrome Fernández Bello et al.

- 2 Matarraz S, López A, Barrena S, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008;22(06):1175–1183
- 3 Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CS, Batista LS, Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res* 2007;31(02):147–155
- 4 Giannouli S, Voulgarelis M. A comprehensive review of myelodysplastic syndrome patients with autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10(12):1679–1688
- 5 Martín M, de Paz R, Jiménez-Yuste V, et al. Platelet apoptosis and agonist-mediated activation in myelodysplastic syndromes. *Thromb Haemost* 2013;109(05):909–919
- 6 Hofmann WK, Koeffler HP. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med* 2005;56:1–16
- 7 Nachtkamp K, Stark R, Strupp C, et al. Causes of death in 2877 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2016;95(06):937–944
- 8 Alessandrino EP, Amadori S, Barosi G, et al; Italian Society of Hematology. Evidence- and consensus-based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology. *Haematologica* 2002;87(12):1286–1306
- 9 Shin KH, Kim IS, Lee HJ, et al. Thromboelastographic evaluation of coagulation in patients with liver disease. *Ann Lab Med* 2017;37(03):204–212
- 10 Álvarez-Román MT, Fernández-Bello I, Jiménez-Yuste V, et al. Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2016;175(05):925–934
- 11 Harrison P, Lordkipanidze M. Testing platelet function. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013;27(03):411–441
- 12 Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost* 2012;10(03):437–446
- 13 Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33(01):4–15
- 14 Piza FM, Corrêa TD, Marra AR, et al. Thromboelastometry analysis of thrombocytopenic dengue patients: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2017;17(01):89
- 15 Lak M, Scharling B, Blemings A, et al. Evaluation of rFVIIa (NovoSeven) in Glanzmann patients with thromboelastogram. *Haemophilia* 2008;14(01):103–110
- 16 Gros A, Ollivier V, Ho-Tin-Noé B. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front Immunol* 2015;5:678
- 17 Psaila B, Bussell JB, Frelinger AL, et al. Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2011;9(11):2302–2310
- 18 Sandes AF, Yamamoto M, Matarraz S, et al. Altered immunophenotypic features of peripheral blood platelets in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2012;97(06):895–902
- 19 Fröbel J, Cadeddu RP, Hartwig S, et al. Platelet proteome analysis reveals integrin-dependent aggregation defects in patients with myelodysplastic syndromes. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(05):1272–1280
- 20 Vericel E, Crosset M, Sedivy P, Courpron P, Dechavanne M, Lagarde M. Platelets and aging. I–Aggregation, arachidonate metabolism and antioxidant status. *Thromb Res* 1988;49(03):331–342
- 21 Terres W, Weber K, Kupper W, Bleifeld W. Age, cardiovascular risk factors and coronary heart disease as determinants of platelet function in men. A multivariate approach. *Thromb Res* 1991;62(06):649–661
- 22 Qiao J, Wu Y, Liu Y, et al. Busulfan triggers intrinsic mitochondrial-dependent platelet apoptosis independent of platelet activation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(09):1565–1572
- 23 Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ* 2016;23(06):952–961
- 24 Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 2011;9(10):1883–1891
- 25 Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(12):2594–2604
- 26 Fager AM, Wood JP, Bouchard BA, Feng P, Tracy PB. Properties of procoagulant platelets: defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(12):2400–2407
- 27 Owens AP III, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011;108(10):1284–1297
- 28 Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 2012;93(04):633–644
- 29 Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(08):1687–1693
- 30 Steppich BA, Braun SL, Stein A, et al. Plasma TF activity predicts cardiovascular mortality in patients with acute myocardial infarction. *Thromb J* 2009;7:11
- 31 Aleman MM, Gardiner C, Harrison P, Wolberg AS. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J Thromb Haemost* 2011;9(11):2251–2261
- 32 Zubairova LD, Nabiullina RM, Nagaswami C, et al. Circulating microparticles alter formation, structure, and properties of fibrin clots. *Sci Rep* 2015;5:17611
- 33 Chiva-Blanch G, Laake K, Myhre P, et al. Platelet-, monocyte-derived and tissue factor-carrying circulating microparticles are related to acute myocardial infarction severity. *PLoS One* 2017;12(02):e0172558
- 34 Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102(07):2678–2683
- 35 Aras O, Shet A, Bach RR, et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004;103(12):4545–4553
- 36 Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007;5(03):520–527
- 37 Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al; Francophone Myelodysplasia Group. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2015;125(23):3618–3626
- 38 Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renné T, ten Cate H, Spronk HM. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* 2012;10(07):1355–1362
- 39 van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, et al; CURAMA study group. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009;94(11):1513–1519
- 40 Horne MK III, Cullinane AM, Merryman PK, Hoddeson EK. The effect of red blood cells on thrombin generation. *Br J Haematol* 2006;133(04):403–408
- 41 Connor DE, Ma DD, Joseph JE. Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thromb Res* 2013;132(05):572–577

Thrombosis and Haemostasis

Haemostasis in Myelodysplastic Syndrome Fernández Bello et al.

- 42 Wolach O, Stone R. Autoimmunity and inflammation in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol* 2016;136(02):108–117
- 43 Gañán-Gómez I, Wei Y, Starczynowski DT, et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2015;29(07):1458–1469
- 44 Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 2014;383(9936):2239–2252
- 45 Okamoto T, Okada M, Mori A, et al. Correlation between immunological abnormalities and prognosis in myelodysplastic syndrome patients. *Int J Hematol* 1997;66(03):345–351
- 46 Marisavljević D, Kraguljac N, Rolović Z. Immunologic abnormalities in myelodysplastic syndromes: clinical features and characteristics of the lymphoid population. *Med Oncol* 2006;23(03):385–391
- 47 Bourgeois E, Caulier MT, Rose C, Dupriez B, Bauters F, Fenaux P. Role of splenectomy in the treatment of myelodysplastic syndromes with peripheral thrombocytopenia: a report on six cases. *Leukemia* 2001;15(06):950–953
- 48 van der Helm LH, Alhan C, Wijermans PW, et al. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. *Br J Haematol* 2011;155(05):599–606
- 49 Jung HA, Maeng CH, Kim M, Kim S, Jung CW, Jang JH. Platelet response during the second cycle of decitabine treatment predicts response and survival for myelodysplastic syndrome patients. *Oncotarget* 2015;6(18):16653–16662
- 50 Adès L, Boehler S, Prebet T, et al. Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion: results of a phase 2 study. *Blood* 2009;113(17):3947–3952

Immune thrombocytopenia – in defence of the platelet count. Response to Hill

The aim of our recently published paper (Alvarez-Roman *et al*, 2016) was not to underestimate the importance of the platelet count but to understand which mechanisms may be involved in the unexpected mild bleeding phenotype observed in some patients with immune thrombocytopenia (ITP) despite the very low platelet counts that, in other clinical contexts, might lead to haemorrhagic manifestations.

In this work, we showed that increased amount of microparticles, resistance to protein C and hypofibrinolysis are mechanisms that, among others described previously (Kim *et al*, 2015), might not only protect ITP patients from bleeding but also contribute to the prothrombotic state observed in the disease.

On the basis of these findings, the possible synergistic effect of the sustained increase in platelet counts due to therapeutic approaches and the prothrombotic background present in ITP patients might increase the risk of thrombosis in some patients. In these scenarios, lack of studies and specific assays to predict risk of thrombosis might complicate therapeutic intervention. In such cases, considering only platelet counts may be simplistic, leading to an incomplete picture of haemostasis in ITP patients under treatment.

Many patients with ITP, even in the setting of severe thrombocytopenia, do not exhibit significant bleeding, showing that correlation between low platelet counts and bleeding might be, at least, controversial (Neunert *et al*, 2015).

Moreover, as in other autoimmune diseases, patients with ITP have a particularly high risk of suffering hypercoagulable disorders (Zoller *et al*, 2012). In a recent study which avoided selection bias, Norgaard *et al* (2016) confirmed the higher incidence of thrombotic/thromboembolic events in a Scandinavian population-based cohort of adults with chronic ITP, of whom 70% of them were considered to have a low comorbidity burden. On the other hand, Boyle *et al* (2013) studied a cohort of 9976 ITP patients, 17.7% of them treated with splenectomy, which increased the risk of abdominal venous thromboembolism (1.6% vs. 1%) and venous thromboembolism (4.3% vs. 1.7%) when compared with patients who did not undergo splenectomy. Results from clinical trials performed with ITP patients receiving agonists to thrombopoietin receptor showed increased risk of experiencing

venous and arterial thrombosis (Rodeghiero, 2016). Therefore, synergies among therapeutic approaches and individual circumstances, such as age and comorbidities, might condition the development of a thrombotic event.

Regarding the use of thromboelastography to predict thrombotic events in patients with ITP, we agree with Dr. Hill that more studies have to be performed to determine its utility in this field. Nevertheless, considering the value of thromboelastography for evaluating haemostasis in trauma patients (Veigas *et al*, 2016), major non-cardiac surgery and liver disease (Shin *et al*, 2017) among other situations, we recommend its use to determine haemostasis in ITP patients with a sustained increase in platelet count.

Perhaps thrombotic events have less impact on mortality than bleeding (Norgaard *et al*, 2011) in ITP patients, but they may complicate ITP management and patient quality of life. Consequently, we must endeavour to avoid/predict their occurrence.

Author contributions

MTAR and IFB collected and verified references included and gave insight/advice regarding their respective areas of expertise. NVB was the principal investigator and wrote the letter. All authors discussed and reviewed the letter.

María T. Álvarez Román¹
Ihosvany Fernández Bello¹
Victor Jiménez-Yuste^{1,2}
Mónica Martín Salces¹
Elena G. Arias-Salgado³
María I. Rivas Pollmar¹
Raúl Justo Sanz¹
Nora V. Butta¹ 

¹Hematology and Hemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain, ²Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, and ³Advanced Medical Projects Madrid, Madrid, Spain

E-mail: nora.butta@salud.madrid.org

MTAR and IFB contributed equally to the work.

Keywords: immune thrombocytopenia, thromboelastometry, platelet count, thrombopoietin-receptor agonists, thrombosis

Correspondence

References

- Alvarez-Roman, M.T., Fernandez-Bello, L., Jimenez-Yuste, V., Martin-Salces, M., Arias-Salgado, E.G., Rivas Pollmar, M.I., Justo Sanz, R. & Butta, N.V. (2016) Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, **175**, 925–934.
- Boyle, S., White, R.H., Brunson, A. & Wun, T. (2013) Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*, **121**, 4782–4790.
- Kim, W.H., Park, J.B., Jung, C.W. & Kim, G.S. (2015) Rebalanced hemostasis in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets*, **26**, 38–42.
- Neunert, C., Noroozi, N., Norman, G., Buchanan, G.R., Goy, J., Nazi, I., Kelton, J.G. & Arnold, D.M. (2015) Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **13**, 457–464.
- Norgaard, M., Jensen, A.O., Engebjerg, M.C., Farikas, D.K., Thomsen, R.W., Cha, S., Zhao, S. & Sorensen, H.T. (2011) Long-term clinical outcomes of patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Blood*, **117**, 3514–3520.
- Norgaard, M., Cetin, K., Maegbaek, M.L., Kristensen, N.R., Ghanima, W., Bahmanyar, S., Stryker, S. & Christiansen, C.F. (2016) Risk of arterial thrombotic and venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study. *British Journal of Haematology*, **174**, 639–642.
- Rodeghiero, F. (2016) Is ITP a thrombophilic disorder? *American Journal of Hematology*, **91**, 39–45.
- Shin, K.H., Kim, I.S., Lee, H.J., Kim, H.H., Chang, C.L., Hong, Y.M., Yoon, K.T. & Cho, M. (2017) Thromboelastographic evaluation of coagulation in patients with liver disease. *Annals of Laboratory Medicine*, **37**, 204–212.
- Veigas, P.V., Callum, J., Rizoli, S., Nascimento, B. & da Luz, L.T. (2016) A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM(R)) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, **24**, 114.
- Zoller, B., Li, X., Sundquist, J. & Sundquist, K. (2012) Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. *Lancet*, **379**, 244–249.

Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia

María T. Álvarez-Román,¹
Ihosvany Fernández-Bello,¹
Victor Jiménez-Yuste,^{1,2}
Mónica Martín-Salces,¹ Elena G.
Arias-Salgado,³ María I. Rivas Pollmar,¹
Raúl Justo Sanz¹ and Nora V. Butta¹

¹Haematology and Haemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, ²Universidad Autónoma de Madrid, and ³Advanced Medical Projects Madrid, Madrid, Spain

Received 21 June 2016; accepted for publication 11 August 2016

Correspondence: Nora V. Butta, Haematology and Haemotherapy Unit, University Hospital La Paz-IdiPaz, Paseo de la Castellana 261, Madrid 28046, Spain.

E-mail: nora.butta@salud.madrid.org

MTAR and IFB contributed equally to the work.

Summary

Despite their low platelet count some immune thrombocytopenia (ITP) patients seldom bleed, indicating the presence of factors to compensate thrombocytopenia. Moreover, ITP patients may have an increased risk for thrombosis. These facts suggest the presence of procoagulant mechanisms that have not been clarified yet. The aim of this study was to identify these possible factors. Moreover, the utility of rotational thromboelastometry (ROTEM[®]) to test haemostasis in these patients was also evaluated. Patients with ITP presented a procoagulant profile due to an increased amount of platelet- and red cell-microparticles, an increased resistance to protein C and the formation of a clot more resistant to fibrinolysis due to augmented levels of plasminogen activator inhibitor-1, which might reflect an endothelial damage/activation in ITP patients. Despite increased maximum clot firmness and reduced lysis, ROTEM[®] profiles showed a prolonged clotting time that might rely on the presence of anti-platelet antibodies as suggested by the increased lagtime in thrombin generation test caused by plasma from ITP patients on platelets from healthy controls. These results indicate the need to individualize therapeutic treatment for ITP patients, considering their procoagulant profile and the presence of concomitant risk factors. Moreover, ROTEM[®] appeared to be useful for evaluating haemostasis in ITP patients.

Keywords: immune thrombocytopenia, thromboelastometry, fibrinolysis, thrombin generation, microparticles.

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disorder in which involves both increased platelet destruction and insufficient platelet production (Cines *et al*, 2009).

Severe bleeding rarely occurs when the platelet count is greater than $30 \times 10^9/L$, usually occurring when the platelet count falls below $10 \times 10^9/L$. Nevertheless, patients can have a range of bleeding manifestations, from none to severe, at a similar platelet count (Provan *et al*, 2010).

Despite their low platelet count, some ITP patients seldom bleed, suggesting the presence of additional mechanisms to compensate thrombocytopenia and ameliorate the haemostasis in such patients.

Moreover, patients with ITP have been recognized as being at an increased risk for thrombosis (Provan *et al*, 2010; Doobaree *et al*, 2016), which can reach twice that of healthy control subjects (Norgaard *et al*, 2016). Thrombotic complications could be due to the disease itself (Sarpawari *et al*,

2010; Norgaard, 2012) as a consequence of ITP therapy (Cheng *et al*, 2011; Lakshmanan & Cuker, 2012) or associated with other diseases, such as antiphospholipid antibody syndrome (Stasi *et al*, 1994; Pierrot-Deseilligny Despujol *et al*, 2008). For example, in a previous study, we observed that an ITP cohort without antecedents of thrombotic events had an increased plasma and microparticle-associated procoagulant profile before and after responding to thrombopoietin receptor agonists (Álvarez Roman *et al*, 2014).

These data indicate that the platelet count is not the only factor to consider when deciding how to treat a patient with ITP, and the global picture of haemostasis should be analysed before choosing a treatment.

Despite the broadly accepted thrombophilic potential of ITP, no robust mechanistic studies have been designed to provide an explanation for this state. The aim of this study was to analyse the possible factors involved in increased

M. T. Álvarez-Román *et al*

thrombosis risk in patients with ITP. The feasibility of using the coagulation global assay rotational thromboelastometry (ROTEM®) to test haemostasis in these patients was also evaluated.

Materials and methods

Subjects

A total of 42 patients with chronic ITP, as defined by Rodeghiero *et al* (2009), with a mean age of 59 ± 17 years and with a platelet count less than $50 \times 10^9/l$ were recruited between January 2014 and December 2015. Thirty-five healthy subjects (59% women, mean age of 55 ± 23 years) were also included in the study.

Patients with uncontrolled hypertension, peripheral or coronary artery disease, abnormal hepatic or renal function tests, a diagnosis of a bleeding disorder or thrombopathy, treatment with drugs that could affect haemostasis or a history of thrombotic episodes were excluded.

The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the study protocol. The research was performed in compliance with the Helsinki Declaration, after receiving a signed patient informed consent form.

The bleeding score was assessed with the World Health Organization (WHO) Bleeding Scale, which has been validated as the standardized method of recording bleeding for patients with chronic ITP across research studies and in clinical practice (Fogarty *et al*, 2012).

The platelet counts were determined with a Coulter Ac Tdiff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

The human peripheral blood samples were collected in 3.8% sodium citrate. For platelet-rich plasma (PRP) whole blood was centrifuged at 152 g for 10 min at 23°C and for platelet-poor plasma (PPP) at 1500 g for 15 min at 23°C followed by two additional centrifugations (first: 15 min at 1500 g; second: 2 min at 13 000 g).

Platelet-poor plasma aliquots were stored at -80°C until analysis. All of the samples were analysed or stored properly within 2 h of sampling.

Determination of platelet activation

All of the samples were analysed within 30–90 min of blood collection.

Platelet-rich plasma was diluted 1:5 with HEPES buffer (10 mmol/l HEPES, 145 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl and 1 mmol/l MgSO_4 , pH 7.4) and incubated with 100 $\mu\text{mol/l}$ thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP; Bachem, Bubendorf, Switzerland) at room temperature (RT). Following incubation, fluorescein-isothiocyanate (FITC) PAC1 (BD Biosciences, Madrid, Spain), a monoclonal antibody (mAb) that recognizes activated conformation of fibrinogen receptors, or FITC-labelled anti-human P-selectin mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was added for 15 min at

RT in the dark. After incubation, the platelets were diluted in HEPES buffer for flow cytometry analysis with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and 10 000 events in the platelet region were acquired and analysed with BD CellQuest Pro™ software (BD Biosciences).

Determination of microparticle and plasma procoagulant activities

Microparticle (MP) procoagulant activity was determined with the ZYMUPHEN MP-Activity kit (HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, France). This kit is based on a prothrombinase assay after MP capture on a micro-titration plate coated with streptavidin and biotinylated annexin V.

The identification of the MP's cellular origin was determined by flow cytometry, labelling MPs with Annexin-V-FITC and the following specific mAb conjugated with phycoerythrin: anti-CD41 mAb for platelets (Biocytex, Marseille, France); anti-CD14 mAb for monocytes, anti-CD144 mAb for endothelial cells, anti-CD235 mAb for red cells and anti-CD45 mAb for leucocytes, all from BD Biosciences.

Rotational thromboelastometry

ROTEM® (Pentapharm, Munich, Germany) is a viscoelastic clotting test that measures the kinetics of clot formation and fibrinolysis, providing global information on cellular and soluble procoagulant/anticoagulant protein interactions. ROTEM was performed on fresh PRP adjusted to 25×10^9 platelets/l with the subjects own PPP. The samples were allowed to rest at RT for 30 min before testing. Recalcification (via non-activated thromboelastometry; NATTEM) was performed to assess the kinetics of clot formation. Clotting time (CT = time from start of measurement until initiation of clotting, in seconds); clot formation time (CFT = time from initiation of clotting to 20 mm amplitude, in seconds, which reflects the speed of the clotting process); alpha angle (tangent to the curve at 2 mm amplitude, in degrees, which reflects the rate of fibrin polymerization); amplitude at "x" time (Ax, in mm); maximum clot firmness (MCF = maximum clot firmness, in mm, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus); and lysis at 60 min (LI60) were recorded.

Calibrated automated thrombogram (CAT)

Thrombin generation was measured in PPP by CAT as described previously (Hemker *et al*, 2003). Coagulation was triggered by proper recalcification and the addition (final concentrations) of 1 pmol/l of recombinant human tissue factor and 4 $\mu\text{mol/l}$ of phospholipid mixture (PPP-Reagent LOW; Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands). Lag-time (= time when 10 nmol/l thrombin is formed); time-to-peak (TTP = time to reach the maximum thrombin concentration); peak height (PH = maximum thrombin

concentration reached); and endogenous thrombin potential (ETP = area under the thrombin-concentration-vs-time curve) were calculated with the Thrombinoscope software package (Thrombinoscope BV).

To test resistance to protein C, CAT experiments were performed with and without the addition of thrombomodulin (TM) (PPP with TM reagents and PPP alone; Thrombinoscope BV). The results were expressed as the ratio [(ETP with TM)/(ETP without ETP)] \times 100.

The effect of plasma from the patients with ITP on thrombin generation of healthy control platelets was tested. To do so, washed platelets were prepared by collecting and centrifuging (650 *g* for 10 min at 23°C) the top two-thirds volumes of PRP from controls after the addition of acid-citrate-dextrose (ACD, 1:10). Platelets were resuspended in HEPES buffer, pooled and divided in to aliquots containing 25×10^6 platelets which were additionally centrifuged (650 *g* for 3 min) after adding ACD 1:10. The platelet pellet was resuspended in 1 ml of PPP from controls, patients with ITP or patients with lupus anticoagulant antibodies (LACs). Coagulation was triggered by platelet stimulation with 100 μ mol/l TRAP.

Coagulation factors, lupus anticoagulant factors and proteins involved in fibrinolysis

Diluted Russell viper venom time (dRVVT, LA 1; Siemens, Madrid, Spain) and silica clotting time (SCT) (Instrumentation Laboratory, Madrid, Spain) were used as screening assays for LACs (ACL TOP 700; Beckman Coulter). Test results from samples with prolonged screening were further analysed via mixing and confirmation tests (LA 2 and SCT), as previously described (Armout, 2001).

Fibrinogen was determined by the Clauss method (ACL TOP 700; Beckman Coulter), factor (F) VIII and FXIII by chromogenic assays and FII, FV, FVII, FIX, FX, FXI and FXII by clotting assays (BCS[®] XP system; Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany).

The human urokinase-plasminogen activator (uPA) and E-selectin kits used were from R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK); tissue plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) kits were obtained from eBioscience (Hatfield, UK); and thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) activity kit was from American Diagnostica (Pfungstadt, Germany). All these substances were determined in PPP samples, following the manufacturer's instructions and measured in Multiskan FC with incubator (ThermoScientific, Madrid, Spain).

Statistics

The statistical analysis of the experimental data was performed by the Biostatistics Unit of La Paz University Hospital using spss 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Shapiro Wilk test was used to test normal distribution. For

Procoagulant Profile in ITP Patients

comparison of multiple groups, a non-parametric one-way ANOVA using Dunn's multiple comparison *post-hoc* test was performed. Comparison of the media of two groups was performed using the Mann Whitney *U* test. The correlations were calculated with Pearson or Spearman tests, depending on the sample distribution. All tests were two-tailed and level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Demographic data of patients with ITP and clinical data

The platelet count of patients with ITP was lower than in healthy controls (ITP patients: $38 \pm 17 \times 10^9/l$; controls: $211 \pm 60 \times 10^9/l$, $P < 0.001$). No differences were found in platelet count, age or clotting factors between the patients with ITP, stratified by gender (Table I).

At sampling, 24 patients were without treatment and 18 were medicated (Table II). Two patients had bleeding manifestations (WHO score = 1), and had platelet counts of $25 \times 10^9/l$ (on treatment with 2 μ g/kg romiplostim plus dexamethasone) and $47 \times 10^9/l$ (treated with 20 mg prednisone).

Microparticles in plasma from patients with ITP

Microparticle-associated procoagulant capacity was shown to be significantly higher ($P < 0.01$) and in above normal ranges (>10 nmol/l) in the patients with ITP than in the controls (Fig 1A).

To determine the cellular source of MPs, flow cytometry analyses were performed and a significant increase was

Table I. Demographic distribution of patients with ITP and their plasma clotting factors.

	Gender	
	Women	Men
ITP patients, <i>n</i> (%)	27 (64.3%)	15 (35.7%)
Platelet count, $\times 10^9/l$	32 ± 15	40 ± 25
Age, years median (range)	59 (22–86)	59 (28–84)
FG Clauss, mg/dl	321 ± 67	312 ± 80
FII, %	126 ± 17	105 ± 4
FV, %	137 ± 19	115 ± 8
FVII, %	123 ± 17	144 ± 33
FVIII, %	178 ± 27	161 ± 54
FIX, %	122 ± 15	102 ± 28
FX, %	126 ± 20	98 ± 13
FXI, %	124 ± 25	98 ± 12
FXII, %	105 ± 24	96 ± 16
FXIII, %	114 ± 25	118 ± 13

All values are given as mean \pm standard deviation unless otherwise indicated.

FG, fibrinogen; ITP, immune thrombocytopenia.

M. T. Álvarez-Román *et al*

Table II. Pharmacological treatment and bleeding score of ITP patients.

Treatment	Female	Male
Without treatment	18	6
Romiplostim		
2 µg/kg	3*	1
3 µg/kg		1
4 µg/kg		1
10 µg/kg + IVIG 1 g/kg × 2 days		1
Eltrombopag		
25 mg/day	1	1
50 mg/day	2	2†
75 mg/day		1‡
Prednisone		
10 mg/day	1	
50 mg/day	1	
Dexamethasone		
1 g/kg × 2 days	1	
IVIG		
1 g/kg × 2 days		1
WHO Bleeding Score		
0	25	15
1	2	

IVIG, intravenous immunoglobulin; WHO, World Health Organization.

*One patient plus dexamethasone.

†Two patients plus prednisone 20 mg.

‡One patient plus prednisone 50 mg.

observed in the percentage of platelet- and red cell-derived MPs in the samples from the patients with ITP (Fig 1B).

In the patients with ITP, MP-associated thrombogenic ability inversely correlated with platelet count (Spearman $r = -0.692$, $P < 0.01$) but not with red cell number. Moreover, the patients with ITP who had the lowest platelet counts showed the most pronounced increase in platelet-derived MPs (Spearman $r = -0.591$, $P < 0.01$).

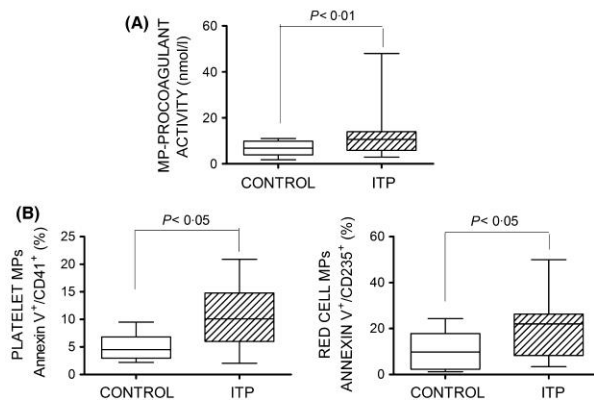


Fig 1. Cellular microparticles in patients with ITP. (A) MP-associated procoagulant activity was determined with the ZYMUPHEN MP-Activity kit. (B) Flow cytometry analysis of MP cellular origin. MPs were labelled with AnnexinV-FITC and a PE-labelled antibody specific for a cellular type. Results are expressed as percentage of total annexin V-labelled microparticles. The Mann-Whitney *U* test was performed and $P < 0.05$ was considered significant. ITP, immune thrombocytopenia; MP, microparticle.

Thromboelastometry studies

ROTEM studies performed with fresh PRP samples showed some significant differences in the dynamics of clot formation when comparing control and ITP samples.

There was a delay in clot formation in the ITP group, as observed by a prolonged CT (control: 550 ± 95 s; ITP: 890 ± 165 s, $P < 0.01$), a diminished alpha angle (control: 62.8 ± 4.3 ; ITP: 53.5 ± 7.5 , $P < 0.05$) and clot firmness assessed as amplitude at 5 min (A5, control: 28.8 ± 3.3 ; ITP: 26.5 ± 7.5 , $P < 0.05$). Nevertheless, clot amplitude at 10 min was similar in both groups, and afterwards, an increased MCF (control: 46.7 ± 3.1 mm; ITP: 52.4 ± 6.1 mm, $P < 0.05$) and reduced LI60 (control: $90.6 \pm 3.0\%$; ITP: $95.5 \pm 3.4\%$, $P < 0.05$) were observed in the ITP samples (Fig 2).

These results showed two singular features in the haemostasis of the patients with ITP: a deferral of clot formation and a higher resistance to fibrinolysis. Under our experimental conditions, this clotting test provided integral information on platelet and plasma procoagulant/anticoagulant protein interactions; thus, we attempted to elucidate the responsibility of each of these elements in this anomalous thromboelastogram profile.

Functional state of platelets from patients with ITP

Platelets from ITP patients had a defect in their ability to be activated, as shown by the lower PAC1 binding and surface exposure of P-selectin after stimulation with TRAP (Fig 3A, B, respectively).

ITP plasma coagulant capacity

Figure 4A shows the CAT parameters obtained with PPP samples from the control subjects and the patients with ITP. Increased ETP (control: 1223.8 ± 257.7 nmol/l × min; ITP:

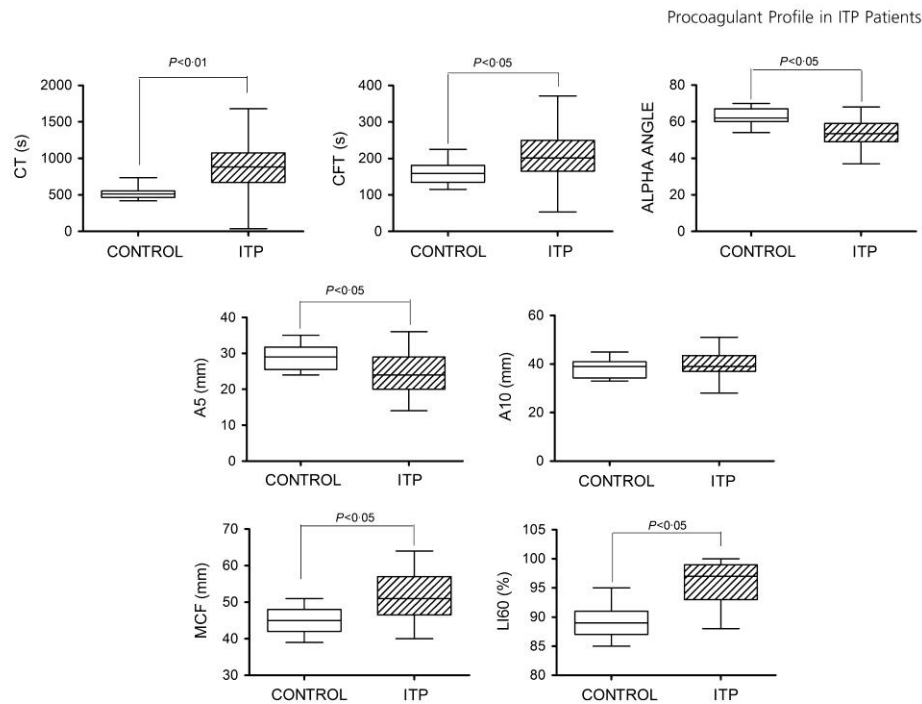


Fig 2. Features of clot formation in patients with ITP. Thromboelastography was performed in platelet rich plasma adjusted to 25×10^9 platelets/l. Detailed procedures and measured parameters are explained in *Materials and methods*. The Mann-Whitney U test was performed and $P < 0.05$ was considered significant. ITP, immune thrombocytopenia; CT, clotting time; CFT, clot formation time; A5, amplitude at 5 min; A10, amplitude at 10 min; MCF, maximum clot firmness; LI60, lysis at 60 min.

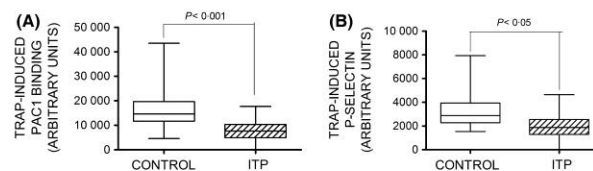


Fig 3. Platelet activation markers after agonist platelet stimulation. Platelets from healthy controls and from patients with immune thrombocytopenia (ITP) were stimulated with thrombin receptor-activating peptide (TRAP), then binding of FITC-PAC1 (A) and of FITC-anti-P-selectin mAb (B) were analysed by flow cytometry. The data were expressed as arbitrary units (mean fluorescence X% of positive cells). The Mann-Whitney U test was performed and $P < 0.05$ was considered significant.

1696.4 ± 524 nmol/l \times min, $P < 0.05$) and peak (control: 225.7 ± 82.8 nmol/l; ITP: 310.4 ± 106.1 nmol/l, $P < 0.05$) were observed in the ITP patients, indicating that plasma from the patients with ITP had a procoagulant profile.

Plasma from ITP patients possessed normal levels of fibrinogen and clotting factors (Table I), so this might not be the cause of the increased procoagulant profile.

We tested whether the higher procoagulant activity of plasma from ITP patients was due to a resistance to protein C, by performing CAT experiments with and without TM. We observed that the mean ratio value in the patients with ITP was slightly higher than the mean ratio of the controls (60 ± 18 and 50 ± 13 , respectively, $P = 0.034$, Fig 4B) indicating some resistance to the protein C system in the ITP group.

M. T. Álvarez-Román *et al*

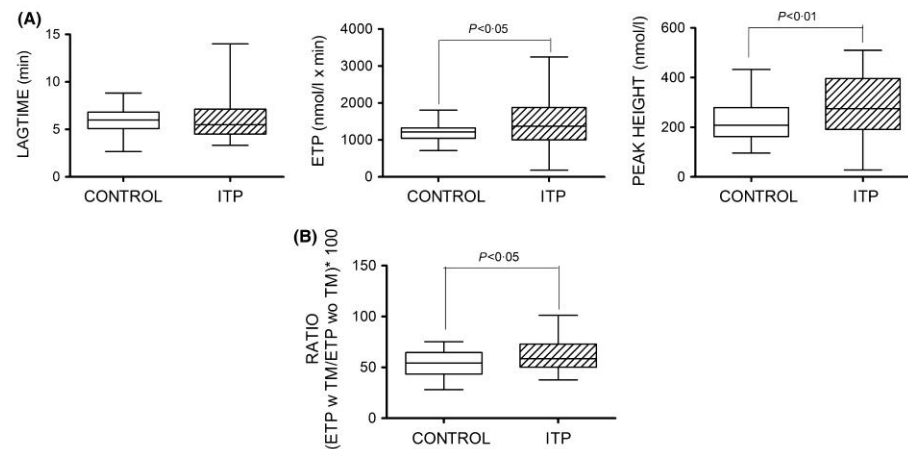


Fig 4. Procoagulant capacity in plasma from patients with ITP. (A) Plasma procoagulant activity was measured by calibrated automated thrombogram (CAT) in platelet poor plasma (PPP) samples triggered by 1 pmol/l of recombinant human tissue factor and 4 μ mol/l of phospholipid mixture. (B) Experiments were performed with and without thrombomodulin and results were expressed as the ratio between them. Detailed procedures and measured parameters are explained in *Materials and methods*. The Mann-Whitney *U* test was performed and $P < 0.05$ was considered significant. ETP, endogenous thrombin potential; ITP, immune thrombocytopenia.

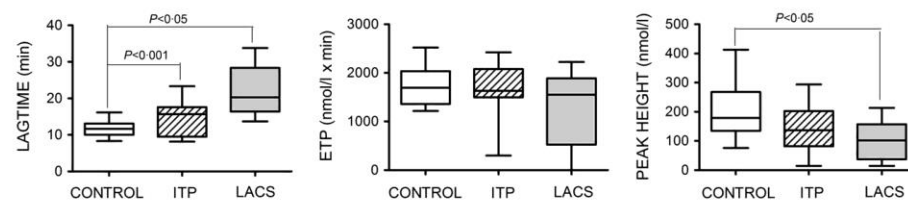


Fig 5. Effect of plasma from patients with ITP on procoagulant capacity of control platelets. Washed control platelets were resuspended and adjusted to 25×10^9 platelets/l with platelet poor plasma (PPP) from controls, patients with ITP or patients with LACS. Coagulation was triggered by stimulation with 100 μ mol/l thrombin receptor-activating peptide (TRAP). Non-parametric one-way ANOVA and Dunn's multiple comparison test were performed and $P < 0.05$ was considered significant. ETP, endogenous thrombin potential; ITP, immune thrombocytopenia; LACS, lupus anticoagulant antibodies.

ITP plasma on the procoagulant capacity of control platelets

Thrombin generation assay (TGA) in PRP samples reflects the combined effect of the clotting factors of PPP plus the procoagulant function of platelets. According to the CAT results presented above, PPP from patients with ITP does not seem to account for the delay in clot formation. Taking into account that ITP is an acquired immune-mediated disorder caused by autoantibodies against platelet proteins, we hypothesized that the delay in clot formation observed in ROTEM® test might be the consequence of a lupus-anticoagulant-like effect related to the presence antibodies against platelets in ITP plasma. So, the effect of ITP and control plasma on the procoagulant capacity of platelets from the healthy controls

was tested. For comparison, the effect of plasma positive for LACS on control platelets was also assayed. PPP from the patients with ITP caused an extension in lagtime for thrombin generation compared with that of the control platelets (control: 10.5 ± 0.5 s; ITP: 15.5 ± 1.2 s, $P < 0.05$) (Fig 5), and had no effect on other CAT parameters. PPP with LACS also increased lagtime (LACS: 22.3 ± 6.7 s, $P < 0.001$) and diminished peak height (control: 220 ± 88 nmol/l; LACS: 100 ± 67 nmol/l, $P < 0.01$).

Fibrinolysis in patients with ITP

To evaluate whether increased LI60 values in ITP patients were due to an imbalance in fibrinolysis-related proteins,

Procoagulant Profile in ITP Patients

Table III. Fibrinolysis-related proteins.

	Control median (range)	ITP median (range)
TAFI, % of activity	32.4 (28.79–37.0)	30.8 (28.0–35.2)
uPA, pg/ml	612.8 (539.9–749.9)	720.5 (634.9–808.8)
tPA, pg/ml	753.0 (578.6–959.0)	750.4 (565.9–912.2)
PAI-1, ng/ml	10.4 (6.6–23.4)	27.01 (16.2–43.8)*
E-Selectin, ng/ml	10.69 (6.57–14.47)	30.49 (17.53–45.33)*

The Mann–Whitney *U* test was performed and $P < 0.05$ was considered significant. Asterisks denote significant differences between groups.

ITP, immune thrombocytopenia; PAI-1, inhibitor-1; TAFI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase plasminogen activator.

tPA, uPA and PAI-1 antigenic plasma levels and TAFI plasma activity were measured. No differences were observed between the patients and the healthy controls except for PAI-1, the level of which was increased in ITP patients (Table III). Because plasma PAI-1 might be increased as a consequence of endothelial damage, plasma concentration of E-selectin, a marker of endothelial injury, was determined. E-selectin was increased in samples from the ITP patients (Table III). MCF correlated with E-selectin (Spearman $r = 0.6643$, $P < 0.001$) and fibrinogen concentrations (Spearman $r = 0.8877$, $P < 0.0001$), whereas LI60 correlated with E-selectin (Spearman $r = 0.6053$, $P < 0.001$).

Discussion

The concept that chronic ITP could have pro-thrombotic characteristics has progressively gained acceptance during the past decade, as various clinical studies have shown an increased risk of thromboembolic events among these patients (Sarpatawari *et al.*, 2010; Severinsen *et al.*, 2011; Norgaard *et al.*, 2016). Nevertheless, no adequate explanation has been provided for this phenomenon.

Although thrombotic complications are reported in up to 6% of patients (Rodeghiero *et al.*, 2013) these events frequently coincide with platelet recovery ($>50 \times 10^9/l$) and rarely occur in the setting of persistent and severe thrombocytopenia.

Our results show that patients with ITP, regardless of their platelet count and treatment, presented a procoagulant profile due to an increased amount of platelet- and red cell-MPs, a slight but significantly increased resistance to protein C and the formation of a clot more resistant to fibrinolysis due to augmented levels of PAI-1. These procoagulant characteristics of ITP patients are not an epiphenomenon caused by low platelet count because samples from patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia showed a MCF and PAI-1 and E-selectin plasma levels similar to those of the healthy control group (data not shown).

Thus, prior to commencing therapeutic treatments, careful clinical evaluation, including an assessment for prothrombotic states, should be considered because they can modify

the prothrombotic profile of patients with ITP (Marie *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2007; Kuter *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011).

Microparticles are small membrane vesicles that are released from many cell types by exocytic budding of the plasma membrane in response to cellular activation or apoptosis. In this work, and in accordance with previous studies (Zucker-Franklin & Karparkin, 1977; Jy *et al.*, 1992; Sewify *et al.*, 2013), we found an increased level of platelet- and red cell-derived MPs in ITP patients compared with controls.

Platelet-derived MPs inversely correlated to platelet count. Given that platelets from the patients with ITP displayed a decreased expression of platelet activation markers than the healthy controls following similar agonist stimulation, MP generation might be due to increased platelet apoptosis. In further support of this hypothesis, enhanced apoptosis in platelets from the patients with ITP has been reported (Qiao *et al.*, 2016).

Other groups also reported the presence of circulating platelet-derived MPs in patients with ITP and demonstrated that ITP patients with higher CD42b⁺ MP counts had a significantly lower risk of bleeding (Connor *et al.*, 2013) but a higher risk of thromboembolic events (Jy *et al.*, 2013). Moreover, circulating platelet-derived MPs with procoagulant activity have been proposed as a potential cause of thrombosis in many diseases (Ando *et al.*, 2002; Goubran *et al.*, 2015).

Regarding the procoagulant properties of red cell-derived MPs, they have been reported to have a broad haemostatic activity because they enhance both primary (platelet) and secondary (coagulation) haemostasis (Jy *et al.*, 2013). This effect on coagulation was due to the exposition of phosphatidylserine and the initiation of thrombin generation independent of TF in a FXII-dependent manner (van der Meijden *et al.*, 2012a).

In this study, thromboelastography with the ROTEM[®] system was a valuable tool for studying haemostasis in patients with ITP. ROTEM[®] technology provides real-time analysis of the viscoelastic properties of clot formation and dissolution. The NATEM test that was employed here is sensitive to any change in the balance of coagulation system but has low specificity (Trelinski *et al.*, 2014).

Analyses of the ROTEM[®] parameters in our cohort of ITP patients showed a prolonged CT, an increased MCF and resistance to clot lysis, highlighting a hypercoagulable profile in these patients when compared with healthy controls. As these experiments were performed in PRP samples adjusted to the same platelet count, differences observed in ROTEM[®] profile of ITP patients were not due to differences in platelet count between both groups. Gunduz *et al.* (2011) employed ROTEM[®] in an attempt to predict bleeding in patients with ITP and observed that MCF was lower in the patients with haemorrhagic symptoms. This result could be explained by the fact that the platelet count in the ITP bleeding group is at least five times lower than in the ITP non-bleeding group.

It has been reported that MCF for patients with ITP and a platelet count below than $100 \times 10^9/l$ was within normal laboratory reference ranges (Kim *et al.*, 2015). This

M. T. Álvarez-Román *et al*

observation suggests the presence of other factors in ITP samples that overcame the effect of low platelet count.

The hypofibrinolysis observed in our study could be due, at least in part, to the increased levels of PAI-1. Increased plasma levels of PAI-1 are considered a marker of endothelial damage (Ostrowski *et al*, 2015). Our observation that plasma PAI-1 and E-selectin levels were augmented in our ITP cohort might suggest endothelial damage in these patients. Endothelial damage in ITP has previously been reported (Fruchter *et al*, 2002) as a consequence of the presence of autoantibodies directed against antigens present on both platelets and endothelial cells or against platelets similar to others present in endothelial cells (Thiagarajan *et al*, 1985; Giltay *et al*, 1989; Majka *et al*, 2007).

Increased circulating MPs, a condition present in patients with ITP, could also support formation of more compact fibrin clots that are less susceptible to fibrinolysis because of their massive incorporation into arterial or venous clots and thrombi (Zubairova *et al*, 2015).

The CT prolongation observed in patients with ITP might be due to platelet function impairment, any plasma component or both of these. Platelet participation in this effect is supported by the fact that platelets from ITP patients had an impaired ability to be stimulated by agonists (Psaila *et al*, 2012; Álvarez Roman *et al*, 2014). To test the possibility that a plasma component was also involved in CT extension, the procoagulant feature of plasma was tested by evaluating thrombin generation using synthetic phospholipids or platelets from healthy controls as phospholipids source.

An enhanced procoagulant profile was observed when plasma from the patients with ITP was trigged with TF and synthetic phospholipids. This effect was due, at least in part, to a resistance to protein C, as suggested by experiments in the presence of TM. On the other hand, our results show a significant prolongation of the lagtime when platelets from the healthy controls stimulated with TRAP were incubated with plasma from the patients with ITP. Because the platelets employed were functional (experiments were performed with a pool of platelets from healthy subjects), and clotting factors and fibrinogen in plasma from the patients with ITP were within normal ranges, the involvement of these elements in the increase in lagtime can be ruled out.

These results were similar to those observed in plasma with LACs. LACs can be detected by their anticoagulant properties in TGA by an increased lagtime. LACs and anti-cardiolipin antibodies are antiphospholipid antibodies that can be found in approximately 40% of adult patients with ITP (Stasi *et al*, 1994; Pierrot-Deseilligny Despujol *et al*, 2008). In our ITP cohort, there were two patients positive

for LACs who were removed from the analyses of the effect of PPP on the procoagulant capacity of platelets. The delay in clot formation might rely on the presence of anti-platelet antibodies in plasma from patients with ITP. In support of this hypothesis, the TGT parameters obtained in PRP samples were diminished by antibodies blocking glycoprotein (GP)IIb-IIIa or GPIb (Reverter *et al*, 1996) by antiplatelet drugs (Herauld *et al*, 1999; van der Meijden *et al*, 2012b) and in the presence of LACs (Devreese *et al*, 2009; present results).

Our study supports the existence of a procoagulant profile that seems to be caused by several pathological mechanisms in an ITP cohort that had not undergone thrombotic events.

Taking into account this information and following the recommendations of Rodeghiero (2016) the treatment of patients with ITP should be individualized, taking into consideration their procoagulant profile and the presence of concomitant risk factors that can be further modified (e.g. smoking, oral contraceptive use and lifestyle considerations) and limited to those patients at risk of bleeding. This study has identified that thromboelastography is a useful tool to evaluate this pathological condition in patients with ITP. Given that this technique assesses global information on cellular and soluble procoagulant/anticoagulant protein interactions, it should be the method of choice to guide therapeutic treatment when available.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the FIS-FEDER, PI12/01831 and PI15/01457 (NVB). NVB holds a Miguel Servet II tenure track grant from FIS-FEDER. The authors would like to thank the skilful collaboration of nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Haematology Unit of Hospital Universitario La Paz.

Authorship contribution

IFB, EGAS and RJ performed the experiments. MTAR, MMS, MIRP and VJY diagnosed and provided clinical care to ITP patients. MTAR, MMS and MIRP collected and verified patient information. MTAR, IFB, VJ-Y and NVB analysed the results. IFB and NVB designed the experiments. NVB was the principal investigator and wrote the paper.

Conflicts of interest

No competing interests to declare.

References

Álvarez Roman, M.T., Fernández Bello, I., Arias-Salgado, E.G., Rivas Pollmar, M.I., Jiménez Yuste, V., Martín Salces, M. & Butta, N.V.

(2014) Effects of thrombopoietin receptor agonists on procoagulant state in patients with immune thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, 112, 65–72.


Ando, M., Iwata, A., Ozeki, Y., Tsuchiya, K., Akiba, T. & Nihei, H. (2002) Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis

- in uremic patients. *Kidney International*, **62**, 1757–1763.
- Arnout, J. (2001) Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis*, **86**, 83–91.
- Cheng, G., Saleh, M.N., Marcher, C., Vasey, S., Mayer, B., Aivado, M., Arning, M., Stone, N.L. & Bussel, J.B. (2011) Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *Lancet*, **377**, 393–402.
- Cines, D.B., Bussel, J.B., Liebman, H.A. & Luning Prak, E.T. (2009) The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*, **113**, 6511–6521.
- Connor, D.E., Ma, D.D. & Joseph, J.E. (2013) Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thrombosis Research*, **132**, 572–577.
- Devreese, K., Peeterlinck, K., Arnout, J. & Hoylaerts, M.F. (2009) Laboratory detection of the antiphospholipid syndrome via calibrated automated thrombography. *Thrombosis and Haemostasis*, **101**, 185–196.
- Doobaree, I.U., Nandigam, R., Bennett, D., Newland, A. & Provan, D. (2016) Thromboembolism in adults with primary immune thrombocytopenia: a systematic literature review and meta-analysis. *European Journal of Haematology*, **97**, 321–330.
- Fogarty, P.F., Tarantino, M.D., Brainsky, A., Signorovitch, J. & Grotzinger, K.M. (2012) Selective validation of the WHO Bleeding Scale in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Current Medical Research and Opinion*, **28**, 79–87.
- Fruchter, O., Blich, M. & Jacob, G. (2002) Fatal acute myocardial infarction during severe thrombocytopenia in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *American Journal of the Medical Sciences*, **323**, 279–280.
- Gilray, J.C., Brinkman, H.J., Modderman, P.W., von dem Borne, A.E. & van Mourik, J.A. (1989) Human vascular endothelial cells express a membrane protein complex immunohistochemically indistinguishable from the platelet VLA-2 (glycoprotein Ia-IIa) complex. *Blood*, **73**, 1235–1241.
- Goubran, H., Sabry, W., Koth, R., Seghatchian, J. & Burnouf, T. (2015) Platelet microparticles and cancer: an intimate cross-talk. *Transfus Apher Sci*, **53**, 168–172.
- Gunduz, E., Akay, O.M., Bal, C. & Gulbas, Z. (2011) Can thrombelastography be a new tool to assess bleeding risk in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura? *Platelets*, **22**, 516–520.
- Hemker, H.C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T. & Beguin, S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, **33**, 4–15.
- Herault, J.P., Dol, F., Gaich, C., Bernat, A. & Herbert, J.M. (1999) Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat. *Thrombosis and Haemostasis*, **81**, 957–960.
- Huerta, C., Johansson, S., Wallander, M.A. & Garcia Rodriguez, L.A. (2007) Risk factors and short-term mortality of venous thromboembolism diagnosed in the primary care setting in the United Kingdom. *Archives of Internal Medicine*, **167**, 935–943.
- Jy, W., Horstman, L.L., Arce, M. & Ahn, Y.S. (1992) Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **119**, 334–345.
- Jy, W., Johansen, M.E., Bidot, Jr, C., Horstman, L.L. & Ahn, Y.S. (2013) Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. *Thrombosis and Haemostasis*, **110**, 751–760.
- Kim, W.H., Park, J.B., Jung, C.W. & Kim, G.S. (2015) Rebalanced hemostasis in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets*, **26**, 38–42.
- Kuter, D.J., Rummel, M., Boccia, R., Macik, B.G., Pabinger, I., Selleslag, D., Rodeghiero, F., Chong, B.H., Wang, X. & Berger, D.P. (2010) Romiplostim or standard of care in patients with immune thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*, **363**, 1889–1899.
- Lakshmanan, S. & Cukier, A. (2012) Contemporary management of primary immune thrombocytopenia in adults. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **10**, 1988–1998.
- Majka, M., Kijowski, J., Lesko, E., Gozdick, J., Zupanska, B. & Ratajczak, M.Z. (2007) Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells – implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **45**, 27–32.
- Marie, I., Maurey, G., Herve, F., Hellot, M.F. & Levesque, H. (2006) Intravenous immunoglobulin-associated arterial and venous thrombosis: report of a series and review of the literature. *British Journal of Dermatology*, **155**, 714–721.
- van der Meijden, P.E., Van Schilfgaarde, M., Van Oerle, R., Renne, T., ten Cate, H. & Spronk, H.M. (2012a) Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **10**, 1355–1362.
- van der Meijden, P.E., Feijge, M.A., Swieringa, F., Gilio, K., Nergiz-Unal, R., Hamulyak, K. & Heemskerk, J.W. (2012b) Key role of integrin α (IIb) β (3) signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**, 3481–3492.
- Norgaard, M. (2012) Thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia. *Thrombosis Research*, **130**, S74–S75.
- Norgaard, M., Cetin, K., Maegbaek, M.L., Kristensen, N.R., Ghanima, W., Bahmanyar, S., Stryker, S. & Christiansen, C.E. (2016) Risk of arterial thrombotic and venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study. *British Journal of Haematology*, **174**, 639–642.
- Ostrowski, S.R., Haase, N., Müller, R.B., Möller, M.H., Pott, F.C., Perner, A. & Johansson, P.I. (2015) Association between biomarkers of endothelial injury and hypocoagulability in patients with severe sepsis: a prospective study. *Critical Care*, **19**, 191.
- Pierrot-Descelligny Despujol, C., Michel, M., Khellaf, M., Gouault, M., Intrator, L., Bierling, P. & Godeau, B. (2008) Antiphospholipid antibodies in adults with immune thrombocytopenic purpura. *British Journal of Haematology*, **142**, 638–643.
- Provan, D., Stasi, R., Newland, A.C., Blanchette, V.S., Bolton-Maggs, P., Bussel, J.B., Chong, B.H., Cines, D.B., Gernsheimer, T.B., Godeau, B., Grainger, J., Greer, I., Hunt, B.J., Imbach, P.A., Lyons, G., McMillan, R., Rodeghiero, F., Sanz, M.A., Tarantino, M., Watson, S., Young, J. & Kuter, D.J. (2010) International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, **115**, 168–186.
- Psaila, B., Bussel, J.B., Linden, M.D., Babula, B., Li, Y., Barnard, M.R., Tate, C., Mathur, K., Frelinger, A.L. & Michelson, A.D. (2012) In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood*, **119**, 4066–4072.
- Qiao, J., Liu, Y., Li, D., Wu, Y., Li, X., Yao, Y., Niu, M., Fu, C., Li, H., Ma, P., Li, Z., Xu, K. & Zeng, L. (2016) Imbalanced expression of Bcl-xL and Bax in platelets treated with plasma from immune thrombocytopenia. *Immunologic Research*, **64**, 604–609.
- Reverter, J.C., Beguin, S., Kessels, H., Kumar, R., Hemker, H.C. & Coller, B.S. (1996) Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and “clinical restenosis”. *Journal of Clinical Investigation*, **98**, 863–874.
- Rodeghiero, F. (2016) Is ITP a thrombophilic disorder? *American Journal of Hematology*, **91**, 39–45.
- Rodeghiero, F., Stasi, R., Gernsheimer, T., Michel, M., Provan, D., Arnold, D.M., Bussel, J.B., Cines, D.B., Chong, B.H., Cooper, N., Godeau, B., Lechner, K., Mazzacconi, M.G., McMillan, R., Sanz, M.A., Imbach, P., Blanchette, V., Kuhne, T., Ruggeri, M. & George, J.N. (2009) Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, **113**, 2386–2393.
- Rodeghiero, F., Michel, M., Gernsheimer, T., Ruggeri, M., Blanchette, V., Bussel, J.B., Cines, D.B., Cooper, N., Godeau, B., Greinacher, A., Imbach, P., Khellaf, M., Klaassen, R.J., Kuhne, T., Liebman, H., Mazzacconi, M.G., Newland, A.,

M. T. Álvarez-Román *et al*

- Pabinger, I., Tosetto, A. & Stasi, R. (2013) Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood*, 121, 2596–2606.
- Sarpatwari, A., Bennett, D., Logie, J.W., Shukla, A., Beach, K.J., Newland, A.C., Sanderson, S. & Provan, D. (2010) Thromboembolic events among adult patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General Practice Research Database. *Haematologica*, 95, 1167–1175.
- Severinsen, M.T., Engebjerg, M.C., Farkas, D.K., Jensen, A.O., Norgaard, M., Zhao, S. & Sørensen, H.T. (2011) Risk of venous thromboembolism in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *British Journal of Haematology*, 152, 360–362.
- Sewify, E.M., Sayed, D., Abdel Aal, R.E., Ahmad, H.M. & Abdou, M.A. (2013) Increased circulating red cell microparticles (RMP) and platelet microparticles (PMP) in immune thrombocytopenic purpura. *Thrombosis Research*, 131, e59–e63.
- Stasi, R., Stipa, E., Masi, M., Oliva, F., Sciarra, A., Perrotti, A., Olivieri, M., Zaccari, G., Gandolfo, G.M., Galli, M., Barbui, T. & Papa, G. (1994) Prevalence and clinical significance of elevated antiphospholipid antibodies in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 84, 4203–4208.
- Thiagarajan, P., Shapiro, S.S., Levine, E., DeMarco, L. & Yalcin, A. (1985) A monoclonal antibody to human platelet glycoprotein IIIa detects a related protein in cultured human endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 75, 896–901.
- Trelinski, J., Misiewicz, M., Robak, M., Smolewski, P. & Chojnowski, K. (2014) Assessment of rotation thromboelastometry (ROTEM) parameters in patients with multiple myeloma at diagnosis. *Thrombosis Research*, 133, 667–670.
- Zubairova, L.D., Nabiullina, R.M., Nagaswami, C., Zuev, Y.F., Mustafin, I.G., Litvinov, R.I. & Weisel, J.W. (2015) Circulating microparticles alter formation, structure, and properties of fibrin clots. *Scientific Reports*, 5, 17611.
- Zucker-Franklin, D. & Karpatisin, S. (1977) Red-cell and platelet fragmentation in idiopathic autoimmune thrombocytopenic purpura. *New England Journal of Medicine*, 297, 517–523.

ASH Home [Blood App](#) [Alerts](#) [RSS](#) [Cookie Settings](#) [Sign In](#)

 [search](#) [Advanced Search](#)

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

Advertisement

[Home](#) [About](#) [Authors](#) [Submit](#) [Subscriptions](#) [Classifieds](#) [Blood Journals](#) [f](#) [t](#) [in](#) [in](#)

[Current Issue](#) [First Edition](#) [Collections](#) [All Issues](#) [Abstracts](#) [Video Library](#)

Platelet Apoptosis and PAI-1 Content Are Involved in the Procoagulant Profile of Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Agonists of Thrombopoietin Receptor.

Raul Justo Sanz, Elena Monzón Manzano, Ihsosvany Fernández-Bello, Teresa Álvarez-Roman, Mónica Martín, María Isabel Rivas Pollmar, Miguel A. Canales, Víctor Jiménez-Yuste, and Nora Butta

Blood 2018 132:3738; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-115898>

[Article](#) [Figures & Data](#) [Info & Metrics](#)

Abstract

Background: The treatment goal for patients with immune thrombocytopenia (ITP) is to raise platelet counts to levels that minimize or stop bleeding. Thrombopoietin receptor agonists (TPO-RAs) have been successfully and extensively employed as second-line therapy for ITP. TPO-RAs, however, have a small but significant increase in the risk of thrombosis.

Aim: The aim of this study was to elucidate the mechanisms involved in the procoagulant effect of TPO-RAs.

Methods: This is a prospective, observational and transversal study. Eighty-two patients with chronic primary ITP, 40 without treatment for at least six months (UT-ITP) and 42 responders to TPO-RA therapy (64.3% with eltrombopag and 35.7% with romiplostim) were recruited. One hundred and twelve healthy participants were also included.

ROTEM® (naTEM test: only recalcification) was performed on platelet rich plasma adjusted to a platelet count of $25 \times 10^9/L$. Clotting time (CT, time from start of measurement until 2 mm of amplitude [in seconds], alpha angle, which reflects the rate of fibrin polymerisation (tangent to the curve at 2 mm amplitude [in degrees]), maximum clot firmness, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus (MCF, [in mm]) and LI60, which describes the percentage of maximum clot strength present at 60 min (in %), were recorded.

Surface exposure of phosphatidylserine (PS), active caspase-3, -8 or -9 and prothrombinase complex binding to platelets were assessed by flow cytometry.

Plasma and platelet levels of PAI-1 were determined by ELISA (eBioscience Ltd., Hatfield, United Kingdom). The effect of TPO and romiplostim on PAI-1 content of MEG-01 cells was evaluated by Western blot. Three MEG-01 cell cultures were initiated simultaneously: control without drugs and treated with either TPO (100 ng/mL) or romiplostim (53 µg/mL). Samples were collected at the start and after 24, 48 and 72 hours to determine the PAI-1 content.

The statistical analysis was performed using SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results: The ROTEM® studies showed significant differences in the dynamics of clot formation when comparing the control with ITP samples.

There was a delay in clot formation in the UT-ITP group, as observed by a prolonged CT [expressed as median (p25–p75): control: 516 (490–633) s; UT-ITP: 938 (914–1348) s, $p < 0.001$], and a diminished alpha angle (mean ± SD; control: 61.7 ± 5.6 degrees; UT-ITP: 49.2 ± 7.3 degrees, $p < 0.05$). Nevertheless, samples from patients

Advertisement

[Previous](#)

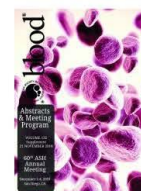


Table of Contents
Volume: 132
Issue: Suppl 1
Pages: 3738
DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-115898>

[Email](#) [Powerpoint](#)
[Alerts](#) [Request Permissions](#)
[Citation Tools](#) [Share](#)
[Cite This](#)

[Twitter](#) [Facebook](#) [Google+](#)

Jump to

- [Article](#)
- [Figures & Data](#)
- [Info & Metrics](#)

Related Articles

No related articles found.

with UT-ITP reached the same MCF as those from healthy controls (control: 45.3±2.4 mm; UT-ITP: 46.9±3.7 mm). On the other hand, patients with ITP undergoing TPO-RA therapy presented an initial clot formation similar to that of the control group [expressed as median (p25–p75): CT, 672 (598–928) s; alpha angle, 55.8±5.8 degrees] but achieved a higher MCF (53.1±4.5 mm, p<0.05) and a reduced clot lysis after 60 min (control: 91.8±4.0%; UT-ITP: 93.7±4.0%, TPO-RA ITP: 97.6±1.7, p<0.05).

Higher values of MCF observed with platelets from ITP patients treated with TPO-RAs might be a consequence of their augmented apoptosis signs: platelets from this group exposed more PS than controls and this situation was accompanied by an increased activity of caspases-3,7, -8 and -9 (Figure 1 A and B). Moreover, platelets from ITP patients on treatment with TPO-RAs bound more prothrombinase complex than platelets from UT-ITP patients and healthy controls (Figure 1 C).

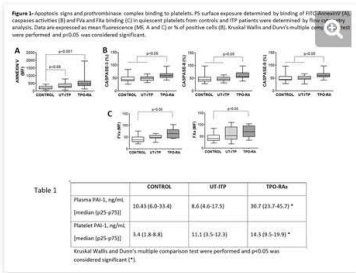
Reduced clot lysis observed in ITP patients treated with TPO-RA was due, at least in part, to increased plasma and platelet levels of PAI-1 (Table 1).

Increase in platelet content of PAI-1 might be the result of the effect of TPO-RAs during megakaryopoiesis since treatments of MEG-01 cells with TPO or romiplostim induced a 3-fold increase in their endogenous PAI-1 content after an incubation period of 48 hs.

Conclusion: The patients with ITP undergoing TPO-RAs therapy presented a procoagulant profile due to the formation of a more fibrinolysis-resistant clot because of increased platelet and plasma PAI-1 levels.

Moreover, platelets from this group of patients showed more signs of apoptosis that causes a higher exposure of PS and, consequently, a larger surface for the binding of the prothrombinase complex.

Work supported by grant from FIS-FEDER PI15/01457. NB holds a Miguel Servet II (FIS-FEDER CP14/00024).



[Download figure](#) | [Open in new tab](#) | [Download powerpoint](#)

Disclosures **Álvarez-Roman:** *Sobi*; Consultancy; **NovoNordisk:** Consultancy; **Shire:** Consultancy; **Jimenez-Yuste:** *Grifols*; Consultancy, Research Funding; **Octapharma:** Consultancy, Research Funding; **CSL Behring:** Consultancy; **Bayer:** Consultancy, Research Funding; **Roche:** Consultancy, Research Funding; **Shire:** Consultancy, Research Funding; **Sobi:** Consultancy, Research Funding; **Pfizer:** Consultancy, Research Funding; **NovoNordisk:** Consultancy, Research Funding; **Butta:** *FIS-Fondos FEDER:* Research Funding.

• „*“ Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2018 by The American Society of Hematology

Potential Articles of Interest

Platelet Protein Glycosylation in Immune Thrombocytopenia
Elena Manózn Manózn et al., Blood

Distinctive Platelet Features and Lymphocyte Sets Distribution in Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Thrombopoietin Receptor Agonists
María Isabel Rivas Pollmar et al., Blood

Thrombin-Generating Capacity of Microvesicles (MVs) in Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP): before and during Treatment with

Predicting Treatment Response to Thrombopoietin Receptor Agonists in Immune Thrombocytopenia
PracticeUpdate

Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial
David J Kulter et al., Semantic Scholar

Comparison of functional fibrinogen (FF/CFF) and FIBTEM in surgical patients – a retrospective study

[Thrombopoietin-Receptor Agonists \(TPO-RA\)](#)
Lamyra Garabet et al., *Blood*

[Thrombopoietin Level Predicts Response to Treatment with Eltrombopag and Romiplostim in Immune Thrombocytopenia](#)
Hanny Al-Samkari et al., *Blood*

[Effects of Anti-Glycoprotein Antibodies on Response of Immune Thrombocytopenia Patients to Thrombopoietin Receptor Agonists and on Megakaryocytes Viability](#)
Marina Izak Karaev et al., *Blood*

[A randomized, double-blind study of romiplostim to determine its safety and efficacy in children with immune thrombocytopenia.](#) [↗](#)
James B Bussel et al., *Semantic Scholar*

[Whole blood thromboelastometry profiles in women with preeclampsia](#) [↗](#)
Luca Spiezia et al., *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*


Powered by **TREND MD**

I consent to the use of Google Analytics and related cookies across the TrendMD network (widget, website, blog). [Learn more](#)

[⏪ Previous](#)

[⬆️ Back to top](#)

Advertisement



blood[®]

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology
2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036
Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

About *Blood*

Subscriptions

Newsroom

Copyright

Public Access

Permissions

Submit to *Blood*

Blood App

Alerts

RSS

Contact Us

Order Reprints

Information for:


Authors

Subscribers

Institutions/Librarians


Advertising in *Blood*

Terms and Conditions



297

[ASH Home](#) [Blood App](#) [Alerts](#) [RSS](#) [Cookie Settings](#) [Sign In](#)



blood[®]

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

search

Advanced Search

Advertisement

[Home](#) [About](#) [Authors](#) [Submit](#) [Subscriptions](#) [Classifieds](#) [Blood Journals](#) [Facebook](#) [Twitter](#) [LinkedIn](#) [Email](#)

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

Platelet Protein Glycosylation in Immune Thrombocytopenia

Elena Monzóñ Manzano, Raul Justo Sanz, Stuart M Haslam, Leow Ke Xuan, Anne Dell, Teresa Álvarez-Roman, Mónica Martín, María Isabel Rivas Pollmar, Ihosvany Fernández-Bello, Miguel A. Canales, Victor Jimenez-Yuste, and Nora Butta
Blood 2018 132:2437; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114568>

Article [Figures & Data](#) [Info & Metrics](#)

Abstract

Introduction: Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease characterized by a low platelet count ($\leq 100 \times 10^9/L$) due to platelet destruction and insufficient platelet production. There is a wide variation in the presentation of the disease, the clinical course and the response to therapeutic treatments.

It has been proposed that certain autoimmune diseases might be caused by changes in glycosylation of cell surface proteins which induce the immune system to recognize cells as "non-self". The aim of this work was to evaluate whether glycosylation might be involved in ITP etiopathogenesis. So, in this preliminary study we aimed to evaluate the glycosylation pattern of platelets from ITP patients, its relationship with platelet features and with the response to treatments.

Methods: Seventy eight ITP patients were recruited: 32 without treatment (UT-ITP) for at least six months, 35 responders to thrombopoietin receptor agonists (TPO-RA, 62.8% with eltrombopag, 27.2 % with romiplostim), and 11 refractory (r-ITP). Eighty one healthy controls were also included.

Human peripheral blood samples were collected in 3.8% sodium citrate.

Platelet activation was determined by flow cytometry (FCM) through binding of FITC-PAC1 (a mAb that recognizes the activated conformation of fibrinogen receptor) after activation with 100 mM thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland). Apoptosis was evaluated by measurement of active caspase-3, -8 or -9 by FCM with a specific kit (Millipore, Madrid, Spain).

Platelet surface exposure of lectins was analyzed with 1 $\mu g/ml$ FITC-conjugated Wheat germ agglutinin lectin (WGA) or 1 $\mu g/ml$ FITC-conjugated Erythrina cristagalli lectin (ECA). WGA binds to sialic acid and N-acetylglucosaminyl residues and ECA is a galactose specific legume lectin.

Glycoprotein derived glycans from a healthy control and from a r-ITP patient were characterized by MALDI-MS based glycomic approaches. N-linked glycans were released from platelet glycoproteins by PNGase F digestion whilst O-linked glycans were released by reductive elimination. Both pools of glycans were permethylated prior to MALDI-MS.

Comparisons of quantitative variables were made with SPSS.22 software.

Results: Platelet count ($\times 10^9/L$) was 269 ± 55 in controls, 141 ± 126 in UT-ITP, 111 ± 85 in TPO-RA and 8 ± 5 in r-ITP. ITP patients with the lowest platelet count showed the most pronounced binding of WGA and ECA (Table 1). Moreover, binding

Advertisement

[Previous](#)



Table of Contents
Volume: 132
Issue: Suppl 1
Pages: 2437
DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114568>

[Email](#)[Alerts](#)[Citation Tools](#)[Cite This](#)

[Powerpoint](#)[Request Permissions](#)[Share](#)

[Tweet](#)[Facebook](#)[Google+](#)

Jump to

- Article
- Figures & Data
- Info & Metrics

Related Articles

No related articles found.

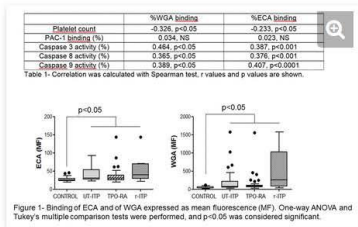
of these lectins showed a mild positive correlation with caspase activities (Table 1). No relationship was observed between platelet ability to be activated and glycosylation features.

When lectins' binding was studied stratifying patients according to their response to therapeutic treatments we observed that platelets from all ITP patients bound more ECA and WGA (Figure 1). Despite no significant differences were observed between ITP groups, r-ITP seemed to bind more WGA.

To increase our knowledge about protein glycosylation of platelet proteins in ITP patients we performed glycomic analyses of platelets from one healthy control and from one r-ITP patient. It was demonstrated that bi-, tri- and tetra-antennary complex type N-glycans are the dominant class of N-glycans with also some high mannose structures. Analysis of sialylated N-glycan, via digestion with sialidase, revealed lower levels of sialylation in r-ITP patient platelets compared to healthy control platelets. Platelet O-glycan data revealed the presence of mucin-type core-1 and core-2 structures.

Conclusion: Glycomic analysis demonstrates that human platelet glycoproteins are modified with a complex array of both N- and O-linked glycans. Preliminary data indicates that there could be changes in glycosylation associated with immune thrombocytopenia. These changes in platelet protein glycosylation might be involved in an enhancement of apoptosis in platelets from ITP patients.

Work supported by grant from FIS-FEDER PI15/01457. NB holds a Miguel Servet II (FIS-FEDER CP14/00024).



Disclosures **Álvarez-Roman:** *Shire*: Consultancy; *NovoNordisk*: Consultancy; *SOBI*: Consultancy; **Jimenez-Yuste:** *Bayer*: Consultancy, Research Funding; *Sobi*: Consultancy, Research Funding; *Pfizer*: Consultancy, Research Funding; *Roche*: Consultancy, Research Funding; *Grifols*: Consultancy, Research Funding; *Octapharma*: Consultancy, Research Funding; *CSL Behring*: Consultancy; *NovoNordisk*: Consultancy, Research Funding; *Shire*: Consultancy, Research Funding; **Butta:** *FIS-Fondos FEDER*: Research Funding.

- * Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2018 by The American Society of Hematology

Potential Articles of Interest

Platelet Features from Immune Thrombocytopenia Patients Refractory to Therapeutic Treatments
Raul Justo Sanz et al., *Blood*

Autoantibodies to Thrombopoietin and the Thrombopoietin Receptor in Patients with Immune Thrombocytopenia
Ishac Nazy et al., *Blood*

Platelet Apoptosis and PAI-1 Content Are Involved in the Procoagulant Profile of Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Agonists of Thrombopoietin Receptor.
Raul Justo Sanz et al., *Blood*

Platelet Dysfunction and Cellular Microparticles May be Involved in the Hypercoagulable State Observed in Obstructive Sleep Apnea Syndrome
Ihosvany Fernandez-Bello et al., *Blood*

Distinctive Platelet Features and Lymphocyte Sets Distribution in Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Thrombopoietin Receptor Agonists
Maria Isabel Rivas Pollmar et al., *Blood*

Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells.
Koh Amano et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*

From structural to functional glycomics: core substitutions as molecular switches for shape and lectin affinity of N-glycans
Sabine André et al., *Biological Chemistry*

Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey
Mengmeng Wang et al., *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*

Glycome profiling using modern glycomics technology: technical aspects and applications
Dieter Vanderschaeghe et al., *Biological Chemistry*

The galectin lattice at a glance.
Ivan R Nabi et al., *J Cell Sci*

Powered by **TREND MD**

I consent to the use of Google Analytics and related cookies across the TrendMD network (widget, website, blog). [Learn more](#)


Yes


No

Previous

Back to top

Advertisement





Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology

2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036

Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

About *Blood*

Subscriptions

Newsroom

Copyright

Public Access

Permissions

Submit to *Blood*

Blood App

Alerts

RSS

Contact Us

Order Reprints

Information for:

Authors

Subscribers

Institutions/Librarians

Advertising in *Blood*

Terms and Conditions

ASH Home

Research

Education

Advocacy

Meetings

Publications

ASH Store

Blood Journals

f

t

in

in


Advertisement

Copyright © 2018 by American Society of Hematology

Privacy Policy

Terms of Service


Contact Us



300

[ASH Home](#)
[Blood App](#)
[Alerts](#)
[RSS](#)
[Cookie Settings](#)

[Sign In](#)


blood[®]

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

[Advanced Search](#)

[About](#)
[Authors](#)
[Submit](#)
[Subscriptions](#)
[Classifieds](#)

[Blood Journals](#)
[f](#)
[t](#)
[in](#)

[Current Issue](#)
[First Edition](#)
[Collections](#)
[All Issues](#)
[Abstracts](#)
[Video Library](#)

Platelet Features from Immune Thrombocytopenia Patients Refractory to Therapeutic Treatments

Raul Justo Sanz, Teresa Álvarez-Roman, Mónica Martín, Elena Monzón Manzano, Ihosvany Fernandez-Bello, María Isabel Rivas Pollmar, Gonzalo Carreño Gomez-Tarragona, Miguel A. Canales, Victor Jimenez-Yuste, and Nora Butta

Blood 2017 130:2316;

[Article](#) [Figures & Data](#) [Info & Metrics](#)

Advertisement

Abstract

Background: Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disorder in which patients have wide variations in the number, activity and characteristics of their platelets. The goal of treatment of ITP is to raise platelet count to a level that will decrease or stop bleeding. Depending on the platelet count and the bleeding symptoms of each patient, therapeutic management is different. Pharmacological approaches employed for ITP treatment mainly aim to boost platelet count or to suppress immune system. Nevertheless, their single or combined application has been tried with a limited outcome in some ITP patients. These refractory patients constitute a clinical challenge. Identifying features of platelets from refractory ITP patients might be useful for a better understanding and management of this special clinical situation.

Conclusion: constitute a clinical challenge. Identifying features of platelets from refractory ITP patients might be useful for a better understanding and management of this special clinical situation.

Objective: This work aimed to determine whether platelets from refractory ITP patients have some distinguishing characteristic different from those from ITP patients responders to treatments (corticoids and thrombopoietin receptor-agonists).

Methods: Citrated blood samples from 71 patients with primary chronic ITP responders to first or second line treatments and from 10 refractory ITP patients were included.

Platelet surface receptors were analysed by flow cytometry (FCM, FACScan, BD Biosciences) with specific monoclonal antibodies against CD41/ α Ib and CD61/ β 3, CD42a and CD42b.

Platelet activation was assessed by FCM through PAC1-FITC binding (a mAb that recognizes activated conformation of fibrinogen receptor) after stimulation with 100 μ M TRAP (agonist of the PAR-1 receptor) and with 10 μ M ADP.

Platelet apoptosis was analysed by FCM through FITC-annexin V (BD Pharmingen) binding to phosphatidylserine (PS) exposed on platelet membrane under basal conditions and by determination of caspases -3, -8, and -9 activities (BD Millipore).

Platelet surface exposure of lectins were analyzed, respectively, with 1 μ g/ml FITC-conjugated Wheat germ agglutinin lectin (WGA) or 1 μ g/ml FITC-conjugated Erythrina cristagalli lectin (ECL). WGA binds to sialic acid and N-acetylglucosaminyl residues and ECL is a galactose specific legume lectin.

Comparisons of quantitative variables were made with SPSS.22 software.

Results: Platelets from refractory ITP patients showed a lower ability for being

[Previous](#)



[Table of Contents](#)
Volume: 130
Issue: Suppl 1
Pages: 2316
[Table of Contents](#)
Volume: 130
Issue: Suppl 1
Pages: 2316
DOI: <https://doi.org/>

[Email](#)
[Alerts](#)
[Citation Tools](#)
[Cite This](#)

[Powerpoint](#)
[Request Permissions](#)
[Share](#)

[Tweet](#) [Like](#) [+1](#)

Jump to

[Article](#)
[Figures & Data](#)
[Info & Metrics](#)

Related Articles

No related articles found.

activated by TRAP or ADP agonists than those from ITP patients responders to treatments. Diminished responses to activation might be due to the reduced surface expression of fibrinogen receptor observed in platelets from refractory ITP patients (TABLE 1).

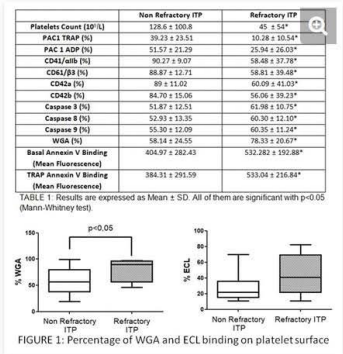
Platelets from refractory ITP patients expressed more PS than those from responders-ITP patients under basal conditions. Moreover, platelets from refractory ITP patients showed higher activity of their caspases -3, -8 and -9 (TABLE 1).

Platelets are known to contain sialic acid on glycoprotein carbohydrate side-chains. Abnormal activation of diverse sialidases causes a loss of sialic acid bound to the carbohydrate side chains of glycoproteins from platelets, leading to increased exposure of β -galactose which favors platelet capture through Ashwell-Morel receptors. This fact provides insights into the potential role of the analysis of the binding of lectins to glycoproteins of platelets from ITP patients.

No differences were observed between groups for binding of ECL (responders ITP patients: 26.71 ± 14.66 , refractory ITP patients: 43.70 ± 26.16). In contrast, binding of WGA was significantly higher in the group of patients with refractory ITP (FIGURE 1).

Conclusion: Platelets of refractory ITP patients had less capacity of activation by agonist stimulation and an enhanced apoptosis than platelets from ITP patients responders to treatments. Moreover, adhesion receptors expressed in their platelet surface were reduced and their glycosylation pattern seemed to differ from those of ITP patients responders to treatments. This observation poses the need of studying glycosylation processes and their consequence in platelet function and half-life.

Work supported by grant from FIS-FEDER PI15/01457. NVB holds a Miguel Servet II (FIS-FEDER CP14/00024).



[Download figure](#) | [Open in new tab](#) | [Download powerpoint](#)

Disclosures **Álvarez-Roman:** *Shire*: Consultancy; *Novo Nordisk*: Consultancy. **Jimenez-Yuste:** *Novo Nordisk*: Consultancy, Honoraria, Research Funding; *Roche*: Consultancy.

* „*” Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2017 by The American Society of Hematology

Potential Articles of Interest

Platelet Protein Glycosylation in Immune Thrombocytopenia
Elena Morzón Manzano et al., Blood

Distinctive Platelet Features and Lymphocyte Sets Distribution in Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Thrombopoietin Receptor Agonists
María Isabel Rivas Pollmar et al., Blood

Treatment of Primary Immune Thrombocytopenia with Thrombopoietin Receptor Agonists: Effect On Platelet Function and Plasma Thrombin Generation
Ihosvany Fernández Bello et al., Blood

The Human Platelet Glycome and Its Variations

Cell surface glycoproteins change during gastrulation in *Pleurodeles waltl*.
J F Rbou et al., J Cell Sci

Glycoprotein IIb-IIIa and the translocation of Rap2B to the platelet cytoskeleton.
M Toril et al., Proc Natl Acad Sci U S A

Evidence for the involvement of PECAM-1 in a receptor mediated signal-transduction pathway regulating capacitation-associated tyrosine phosphorylation in human spermatozoa.
Brett Nixon et al., J Cell Sci

The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha

Among Healthy Volunteers and Storage

Qiyong Peter Liu et al., Blood

In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation.

Bethan Psaila et al., Blood

Z. BUSAİNAC

Eric I Park et al., Proc Natl Acad Sci U S A

Effects of Avatrombopag on Platelet Activation in Patients With Chronic Liver Disease and Thrombocytopenia

PracticeUpdate

Powered by TREND MD

I consent to the use of Google Analytics and related cookies across the TrendMD network (widget, website, blog). [Learn more](#)

Yes


No

Previous

Back to top

Advertisement

ASH | Awards



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology

2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036

Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

About Blood

Subscriptions

Newsroom

Copyright

Submit to Blood

Blood App

Alerts

RSS

Information for:


Authors

Subscribers

Institutions / Librarians

303

[ASH Home](#) [Blood App](#) [Alerts](#) [RSS](#) [Cookie Settings](#) [Sign In](#)



blood[®]

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

Advanced Search

Advertisement

AboutAuthorsSubmitSubscriptionsClassifieds

Blood Journals

[f](#)[t](#)[in](#)[in](#)

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

Distinctive Platelet Features and Lymphocyte Sets Distribution in Immune Thrombocytopaenia Patients Responders to Thrombopoietin Receptor Agonists

Elena Monzón Manzano, Raul Justo Sanz, Ihosvany Fernandez-Bello, Teresa Álvarez-Roman, Mónica Martín, María Isabel Rivas Pollmar, Larissa Valor, Diana Hernandez, Miguel A. Canales, Victor Jimenez-Yuste, and Nora Butta
Blood 2017 130:2315

ArticleFigures & DataInfo & Metrics

Abstract

Background: The heterogeneous pathophysiology of immune thrombocytopaenia (ITP) may explain the wide variation in the presentation of the disease, the clinical course and the response to therapeutic treatments. Among them, agonists of thrombopoietin receptor (TPO-RA) were incorporated as a second line agent for the management of ITP patients who do not respond to other treatments. We hypothesized that platelet and white cells from these patients might present some characteristics different from those observed in ITP patients who don't need to be treated and those responders to a first line therapeutic agent. In order to test this hypothesis we designed this study to evaluate platelet function and distribution of lymphocyte's compartments in three ITP patient's groups: 1) untreated (UT) and treated with 2) TPO-RA or 3) corticoids.

Materials and Methods: We recruited 33 UT ITP patients (30% male), 35 treated with TPO-RA (45% male), 15 with corticoids (25 % male) and 96 healthy controls (42% male).The La Paz University Hospital Ethics Committee approved the experimental protocol.

Platelet-activation, granule's content release, surface exposure of phosphatidylserine (PS) and activities of caspase-3, -8 or -9 were assessed by flow cytometry (respectively performed with PAC1, anti P-selectin and anti-CD63 antibodies, from BD; Annexin V from BD Pharmingen and Millipore kit).

The frequency of T (CD3+, CD4+, CD8+) and B (CD19+) lymphocytes, natural killer (NK) CD56bright and CD56dim and regulatory T (Treg) [CD4+CD25+ forkhead box protein 3(FoxP3)+] were determined by multi-parametric flow cytometry panels (BD Biosciences).

The statistical analysis of the experimental data was using SPSS 9.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results: Platelet count were similar in all ITP groups but lower than controls (p<0.001). Platelet activation, evaluated by binding of PAC1 (antibody that only recognizes the active form of fibrinogen receptor) after the stimulation with TRAP (an agonist for PAR-1 receptors), were equally reduced in all ITP groups. Platelet activation with ADP was only reduced in the TPO-RA ITP patients. A diminished exposure of P-selectin and CD63 was also observed in UT and TPO-RA ITP patients after platelet stimulation with TRAP (Table 1). No differences were observed in surface expression of CD41, CD61, CD42a and CD42b between ITP patients and healthy controls. Platelet apoptosis evaluation showed that ITP patients tended to have an increased activity of caspases -3,7,-8 and -9 activities, but this observation was significant only in the ITP group of treated with TPO-RA (Table 1).

Advertisement

Previous



Table of Contents
Volume: 130
Issue: Suppl 1
Pages: 2315
DOI: <https://doi.org/>

- EmailAlertsCitation ToolsCite This
- PowerpointRequest PermissionsShare

TweetLike+G+

Jump to

- Article
- Figures & Data
- Info & Metrics

Related Articles

No related articles found.

Regarding lymphocytes, no differences were observed in LT subsets among all groups. Intermediate (IM, CD14⁺⁺CD16⁻), but not non-classical (NCM, CD14⁺CD16⁺) and classical (CM, CD14⁺CD16⁺) monocytes were increased in UT and TPO-RA IT patients. CD56^{bright}CD16⁻ NK and CD56^{bright}CD16⁺ NK, abundant cytokine producers with a weak cytotoxic activity, were increased only in TPO-RA IT patients. In this group a diminution was observed in memory LB cells. Regarding LTreg population, their count was reduced in UT and corticoid-treated patients, whereas their values reach normality in the TPO-RA treated group (Table 2).

Conclusions: All ITP patients, untreated or responders to treatment with TPO-RA and corticoids recovered platelet count but not its function. TPO-RA-responders patients showed an increased apoptosis compared to the other ITP patients recruited. Nevertheless, TPO-RA seems to have a beneficial regulatory effect on immune system that might counteract platelet destruction.

Work supported by grant from FIS-FEDER PI15/01457. NVB holds a Miguel Servet II (FIS-FEDER CP14/00024).

[illegible]

[Download figure](#) | [Open in new tab](#) | [Download powerpoint](#)

Disclosures Álvarez-Roman: *Shire*:

Consultancy; *Novo Nordisk*: Consultancy. **Jimenez-Yuste**: *Novo Nordisk*: Consultancy, Honoraria, Research Funding; *Roche*: Consultancy.


- ✱ Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2017 by The American Society of Hematology

[← Previous](#)

[^ Back to top](#)

Advertisement



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology
 2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036
 Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

Current Issue First Edition Collections All Issues Abstracts Video Library	About <i>Blood</i> Subscriptions Newsroom Copyright Public Access Permissions	Submit to <i>Blood</i> <i>Blood</i> App Alerts RSS Contact Us Order Reprints	Information for: Authors Subscribers Institutions/Librarians Advertising in <i>Blood</i> Terms and Conditions
---	--	---	---

[ASH Home](#) |
 [Research](#) |
 [Education](#) |
 [Advocacy](#) |
 [Meetings](#) |
 [Publications](#) |
 [ASH Store](#)


[Blood Journals ▼](#)

Advertisement

Copyright © 2018 by American Society of Hematology
Privacy Policy | Terms of Service | Contact Us

[ASH Home](#)
[Blood App](#)
[Alerts](#)
[RSS](#)
[Cookie Settings](#)

[Sign In](#)


blood[®]

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

Advertisement

[Home](#)
[About](#)
[Authors](#)
[Submit](#)
[Subscriptions](#)
[Classifieds](#)

[Blood Journals](#)
[f](#)
[t](#)
[in](#)

Current Issue
 First Edition
 Collections
 All Issues
 Abstracts
 Video Library

Procoagulant Profile of Platelets from Immune Thrombocytopenia Patients

María Teresa Álvarez Román, Raul Justo Sanz, Elena Monzon Manzano, Monica Martín Salces, Ihsosvany Fernandez Bello, Sergio Rivas Muñoz, María Isabel Rivas Pollmar, Miguel Canales, Victor Jiménez Yuste, and Nora Butta

Blood 2016 128:1370;

Article Info & Metrics

Advertisement

Abstract

Introduction: Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disorder in which both increased platelet destruction and insufficient platelet production are involved. Patients can have a range of bleeding manifestations from none to severe at a similar platelet count. In some cases, patients have fewer bleeding symptoms than expected considering the low platelet count that they might have.

Objective: The aim of this study was to determine the procoagulant profile of platelets from ITP patients in order to determine whether any of their features may explain this observation.

Methods: Twenty-five patients with chronic ITP [$(68 \pm 100) \times 10^9$ platelets/L, mean age: 59.6 ± 16.1 years old, 56% female] and thirty-five healthy controls [$(256 \pm 36) \times 10^9$ platelets/L, mean age: 41.6 ± 13.5 years old, 51% female] were included. Platelet counts were determined with a Coulter Ac. T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain). Citrated blood was centrifuged at 152 g 10 min at 23°C for obtaining platelet rich plasma (PRP).

To obtain washed platelets, the top two-thirds volumes of PRP were collected and centrifuged (650 g for 10 min at 23°C) after the addition of acid-citrate-dextrose (ACD, 1:10) and the pellet was resuspended in an equal volume of HEPES buffer.

Platelet activation was determined by flow cytometry through binding of FITC-PAC1 (a mAb that recognizes activated conformation of fibrinogen receptor) to quiescent and 100 micromol/L thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP, Bachem, Switzerland) or 20 micromol/L ADP.

Apoptosis was determined by flow cytometry analysis through FITC-annexin V binding to phosphatidylserine (PS) exposed on platelet membrane under basal conditions.

To characterize platelet ability to bind coagulation factors, washed platelets ($1 \times 10^8/\text{mL}$) were activated with 100 micromol/L TRAP and then incubated with FVa and/or FXa (5nM each, 10 min, ambient temperature). After fixation with 2% paraformaldehyde to cross-link the platelet-bound factors Va and Xa, platelets were washed two times with Hepes Buffer. Non-specific binding sites were blocked with 8% bovine serum albumin (30 min, room temperature). Following centrifugation, platelets were first incubated with anti-CD41-PE, anti-FVa and/or anti-FXa and then with a secondary FITC-goat anti-mouse IgG and stored at 4°C until flow cytometry analyses.

Results: Platelets from ITP patients showed a basal expression of activated

Full Text
Help

Previous



Table of Contents
Volume: 128
Issue: 22
Pages: 1370
DOI: <https://doi.org/>

Email
Alerts
Citation Tools
Cite This

Request Permissions
Share

[Tweet](#) [Like](#) [+1](#) [G+](#)

Jump to

[Article](#)
[Info & Metrics](#)

Related Articles

No related articles found.

RESULTS: Platelets from ITP patients showed a basal expression of activated fibrinogen receptor similar to controls and a reduced ability for being activated by agonists (% of positive platelets for TRAP-induced PAC1 binding: 60±20 % in controls and 35±23 % in ITP, p<0.01; ADP-induced PAC1 binding: 63±14 % in controls and 50±23 % in ITP, p<0.05). Diminished responses to activation were not due to a reduction in surface expression of fibrinogen receptor in platelets from ITP patients.

Platelets from ITP patients expressed more PS than controls under basal conditions [mean fluorescence (MF) for FITC-annexin V binding was: 336±128 in controls, 588±25 in ITP, p<0.05].

Since the PS is the anchor site of the prothrombinase complex, we studied the binding of FVa and FXa at baseline and after activating platelets with TRAP. The binding of these factors in both conditions was higher in the group of patients with ITP (MF for basal FVa binding: 41.4±14.4 in controls, 58.1±24 in ITP, p <0.02; MF for TRAP-induced FVa binding: 44.1±11.4 in controls, 81.4±38 in ITP, p<0.001; MF for basal FXa binding: 45.7±18.4 in controls, 58.1±24 in ITP, p <0.005; MF for TRAP-induced FXa binding: 46.1±16.4 in controls, 72.0±24 in ITP, p<0.05). The lower the platelet count the higher increase in PS exposure (Spearman r =-0.518, p <0.001) and the union of FVa (Spearman r = -0.8571, p <0.001) and FXa (Spearman r = -0.7455, p<0.05).

Conclusions: Platelets from ITP patients, despite having less capacity of activation by agonist stimulation, have an increased procoagulant surface with greater ability to bind prothrombinase complex (FXaVa) than those from healthy controls. This feature might be a procoagulant compensatory mechanism that could reduce the risk of bleeding in patients with ITP.

This work was supported by a grants from the FIS-FEDER, PI12/01831 and PI15/01457

Disclosures No relevant conflicts of interest to declare.

- * Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2016 by The American Society of Hematology

Potential Articles of Interest

Procoagulant Mechanisms in Patients with Myelodysplastic Syndrome

Ihosvany Fernandez-Bello et al., Blood

Haemostasis in Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Agonists of Thrombopoietin Receptor

Nora Butte et al., Blood

Treatment of Primary Immune Thrombocytopenia with Thrombopoietin Receptor Agonists: Effect On Platelet Function and Plasma Thrombin Generation

Ihosvany Fernández Bello et al., Blood

Characterization of a Heritable Bleeding Disorder in a Horse: Reduce PS-Flip Leads to Progressive Dysfunction in the Common Pathway of Platelet Coagulation.

Jeffrey W. Norris et al., Blood

Effects Of Thrombopoietin Receptor Agonists On APRIL Plasma Levels In Patients With Immune Thrombocytopenia

Mayte Alvarez Román et al., Blood

Managing Antithrombotic Therapy in Immune Thrombocytopenia

PracticeUpdate

Homology model of human prothrombinase based on the crystal structure of Pseutarin C

Anja Pomowski et al., Biological Chemistry

The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation

Anna C. Soderstrom et al., Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)

Prophylactic platelet transfusion does not reduce risk of clinical bleeding in adults with dengue and thrombocytopaenia

Muhammad Zaman Khan Asir et al., Evid Based Med

Efficacy and Safety of Avatrombopag in Chronic Immune Thrombocytopenia

PracticeUpdate

Powered by TREND MD



I consent to the use of Google Analytics and related cookies across the TrendMD network (widget, website, blog). [Learn more](#)

Yes

No

Previous

Back to top

Full Text

Help

Advertisement





Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology
2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036
Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

About *Blood*

Subscriptions

Newsroom

Copyright

Public Access

Permissions

Submit to *Blood*

Blood App

Alerts

RSS

Contact Us

Order Reprints

Information for:


Authors

Subscribers


Institutions/Librarians

Advertising in *Blood*

Terms and Conditions



[ASH Home](#) [Blood App](#) [Alerts](#) [RSS](#) [Cookie Settings](#) [Sign In](#)



blood

Leading the way in experimental and clinical research in hematology

search

Advanced Search

Advertisement

[Home](#) [About](#) [Authors](#) [Submit](#) [Subscriptions](#) [Classifieds](#)

[Blood Journals](#) [Facebook](#) [Twitter](#) [LinkedIn](#) [YouTube](#) [Email](#)

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

Haemostasis in Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Agonists of Thrombopoietin Receptor

Nora Butta, Ihosvany Fernandez Bello, María Teresa Álvarez Román, Monica Martín Salces, Raul Justo Sanz, Elena Monzon Manzano, María Isabel Rivas Pollmar, Sergio Rivas Muñoz, Miguel Canales, and Victor Jiménez Yuste

Blood 2016 128:3743;

Article Info & Metrics

Advertisement

Abstract

Introduction: The goal of treatment of patients with immune thrombocytopenia (ITP) is to raise platelet count to a level that will minimize or stop bleeding. One of the therapeutic strategies employed is to augment platelet production with agonists of the thrombopoietin receptor (TPOR-A). Clinical trials for TPOR-A comparing their effects with placebo showed a reduction in proportion of patients reporting bleeding (Tarantino et al, Blood Coag Fibrinolysis, 2013, 24:284-296). This effect might rely on the increase in platelet count, but other factors known to compensate bleeding risk in thrombocytopenic ITP patients might be regulated by TPOR-A.

Objective: We aimed to compare haemostasis in ITP patients untreated with any pharmacologic agent (UT-ITPp) and treated with TPOR-A (TPOA-Rp) using the coagulation global assays thromboelastometry (ROTEM®) and Calibrated Automated Thrombogram (CAT).

Methods: Thirty chronic UT-ITPp [platelet count: (86±60)×10⁹ platelets/L], twenty six responders to TPOR-A [16 with Romiplostim® and 10 with Revolade®, platelet count: (132±46)×10⁹ platelets/L] and fifty healthy controls were included. Citrated blood was centrifuged at 152 g 10 min at 23°C for obtaining platelet rich plasma (PRP) and at 1,500 g for 15 min at 23°C for platelet-poor plasma (PPP). Aliquots were stored at -80°C until analysis.

Non-activated ROTEM was performed on PRP adjusted to a platelet count of 25 × 10⁹/L. Clotting time (CT, time from start of measurement until initiation of clotting [in seconds], alpha angle, which reflects the rate of fibrin polymerisation (tangent to the curve at 2-mm amplitude [in degrees]), maximum clot firmness, which reflects the maximum tensile strength of the thrombus (MCF, [in mm]) and LI60, which describes the percentage of maximum clot strength present at 60 min (in %), were recorded.

Plasma thrombin generation was measured in PPP using the CAT test at a final concentration of 1 pM tissue factor and 4 microM phospholipids. We evaluated the endogenous thrombin potential (ETP, the total amount of thrombin generated over time); the lag time (the time to the beginning of the explosive burst of thrombin generation); the peak height of the curve (the maximum thrombin concentration produced); and the time to the peak.

Platelet activation was determined by flow cytometry through PAC1-FITC binding after stimulation with 100 micromol/L thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP6). Fibrinolytic activity was tested in PPP using commercialized kits.

Full Text
Help

Previous

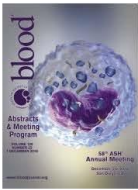


Table of Contents
Volume: 128
Issue: 22
Pages: 3743
DOI: <https://doi.org/>

- [Email](#) [Request Permissions](#)
- [Alerts](#) [Share](#)
- [Citation Tools](#)
- [Cite This](#)

[Twitter](#) [Facebook](#) [LinkedIn](#) [Google+](#)

Jump to

- Article
- Info & Metrics

Related Articles

No related articles found.

(1157). Thrombotic proteins were tested in FFF using commercialized kits.

Comparisons of quantitative variables were made with SPSS.22 software. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results: Platelets from all patients with ITP had a defect in their ability to be activated, as shown by the lower PAC1 binding ($p < 0.001$).

No differences were observed among groups for thrombin generation except for an increase in ETP in both groups of ITP patients [control: 1240 ± 320 nMxmin, UT-ITPp: 1464 ± 443 nMxmin ($p < 0.05$), TPOA-Rp: 1533 ± 390 nMxmin ($p < 0.05$)].

In ROTEM experiments, PRP from UT-ITPp and TPOA-Rp showed a prolonged CT [control: 550 ± 95 sec, UT-ITPp: 1090 ± 75 sec ($p < 0.05$), TPOA-Rp: 859 ± 209 sec ($p < 0.05$)]. Only UT-ITPp presented a diminished alpha angle [control: 60.3 ± 7.5 , UT-ITPp: 49.3 ± 7.3 ($p < 0.05$), TPOA-Rp: 55.8 ± 5.58]. On the other hand, TPOA-Rp had an increased MCF (control: 46.5 ± 2.1 mm, UT-ITPp: 50.2 ± 5.6 mm, TPOA-Rp: 57.9 ± 4.4 mm, $p < 0.05$) and LI60 (control: 91.8 ± 3.1 %, UT-ITPp: 94.1 ± 3.1 %, TPOA-Rp: 97.6 ± 1.1 %, $p < 0.05$).

To evaluate whether increased LI60 values were due to an imbalance in fibrinolysis related proteins, tPA, uPA, TAFI and PAI-1 plasma levels were measured. No differences were observed among the two groups of patients and healthy controls except for PAI-1 which level was increased in TPOA-Rp (control: 12.9 ± 12.3 ng/ml, UT-ITPp: 17.3 ± 12.5 ng/ml, TPOA-Rp: 46.8 ± 20.8 ng/ml $p < 0.05$).

Conclusions: As we previously described, TPOR-A treatment increased platelet count but did not ameliorate their function (Álvarez Román et al, Thromb Haemost. 2014, 112:65-72). Nevertheless, ITP patients responders to TPOR-A showed a haemostasis unbalanced on a hypercoagulable profile due, at least in part, to a hypofibrinolytic pattern mainly caused by an increase in PAI-1 plasma level. This fact, together with the increment in platelet count caused by TPOR-A, might help to protect these patients from bleeding.

This work was supported by a grant from the FIS-FEDER PI15/01457

Disclosures No relevant conflicts of interest to declare.

- * Asterisk with author names denotes non-ASH members.

© 2016 by The American Society of Hematology

Potential Articles of Interest

Procoagulant Profile in Patients with Immune Thrombocytopenia
Nora Butta et al., Blood


Haemostasis Impairment in Patients with Myelodysplastic Syndromes with Normal Platelet Counts
Nora Butta et al., Blood

Platelet Apoptosis and PAI-1 Content Are Involved in the Procoagulant Profile of Immune Thrombocytopenia Patients Responders to Agonists of Thrombopoietin Receptor.
Raul Justo Sanz et al., Blood


Procoagulant Profile of Platelets from Immune Thrombocytopenia Patients
Maria Teresa Álvarez Román et al., Blood

Effects Of Thrombopoietin Receptor Agonists On APRIL Plasma Levels In Patients With Immune Thrombocytopenia
Mayte Álvarez Román et al., Blood

Sustainable development in pollution control and the role of anaerobic treatment 
G. Lettinga et al., Water Sci Technol

Efficacy and Safety of Avatrombopag in Chronic Immune Thrombocytopenia 
PracticeUpdate

Benefits of Thromboelastography and Thrombin Generation Assay for Bleeding Prediction in Patients With Thrombocytopenia or Hematologic Malignancies 
Seon Young Kim et al., Annals of Laboratory Medicine

CP-094 Romiplostim dose escalation in immune thrombocytopenia patients 
L. López Esteban et al., Eur J Hosp Pharm Sci Pract

Managing Antithrombotic Therapy in Immune Thrombocytopenia 
PracticeUpdate

Powered by TREND MD 



I consent to the use of Google Analytics and related cookies across the TrendMD network (widget, website, blog). [Learn more](#)

Yes No


 Previous

 Back to top


Full Text

Help

Advertisement



ASH | Awards



Leading the way in experimental and clinical research in hematology

American Society of Hematology

2021 L Street NW, Suite 900, Washington, DC 20036

Phone 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

Current Issue

First Edition

Collections

All Issues

Abstracts

Video Library

About *Blood*

Subscriptions

Newsroom

Copyright

Public Access

Permissions

Submit to *Blood*

Blood App

Alerts

RSS

Contact Us

Order Reprints

Information for:

Authors

Subscribers

Institutions/Librarians

Advertising in *Blood*

Terms and Conditions

